

# **Expression von EGFR, HER-2 und COX-2 beim Zervixkarzinom: Vergleich von Primärtumoren und Rezidiven**

**Dissertation  
zur Erlangung des akademischen Grades  
Dr. med. dent.**

**an der Medizinischen Fakultät  
der Universität Leipzig**

eingereicht von:  
Julia Fritzsche, geb. Köhler  
geb. am 28.07.1981 in Leipzig

angefertigt an:  
der Universitätsfrauenklinik Leipzig (Tiersches Institut),  
Medizinische Fakultät, Universität Leipzig

Betreuer:  
Herr Professor Dr. med. Lars-Christian Horn,  
Institut für Pathologie der Universität Leipzig

Beschluss über die Verleihung des Doktorgrades vom: 16.07.2013

## **Bibliographische Beschreibung**

Fritzsche, Julia

Expression von EGFR, HER-2 und COX-2 beim Zervixkarzinom: Vergleich von Primärtumoren und Rezidiven

Universität Leipzig, Dissertation

111 Seiten, 188 Literaturangaben, 16 Abbildungen, 11 Tabellen

### **Referat:**

Ziel dieser Studie war es, die Häufigkeit der Expression von EGFR, HER-2 sowie COX-2 im Zervixkarzinom zu eruieren. Dabei galt es herauszufinden, ob Unterschiede hinsichtlich des Nachweises dieser drei, möglicherweise therapeutisch relevanten Moleküle zwischen den primären, nicht vortherapierten und operierten Karzinomen und den multimodal vorbehandelten Rezidiven gab. In der vorliegenden retrospektiven Arbeit wurden 45 TMMR-operierte Primärtumoren und 28 LEER-operierte Rezidivtumoren der Universitätsfrauenklinik Leipzig (Triersches Institut) einbezogen und zusätzlich hinsichtlich der prognostischen Überlebensanalyse durch das Tumorstadium, Lymphknotenmetastasen und Rezidivaufreten sowie histologischer Charakteristika untersucht. Dazu wurden Tissue - Microarrays angefertigt mit anschließender immunhistochemischer Untersuchung dieser.

Die Ergebnisse zeigten, dass die TMMR-Operation die Überlebensprognose signifikant verbessert, denn lediglich bei den LEER-therapierten Rezidivtumoren erlitten die Patientinnen sowohl Fernmetastasen als auch erneute Rezidive. Weder die Expression der drei untersuchten Moleküle noch die histopathologischen Parameter haben eine prognostische Relevanz. Es gibt keine signifikanten Zusammenhänge zwischen der Häufigkeit der Expression von EGFR, HER-2 sowie COX-2 und Primär-, bzw. Rezidivtumoren, sodass

diese Moleküle keine Targets für eine individualisierte, zielgerichtete Therapie beim Zervixkarzinom darstellen.

## Inhaltsverzeichnis

<b>1.</b>	<b>Einleitung .....</b>	<b>7</b>
1.1.	Epidemiologie und Pathogenese des Zervixkarzinoms .....	7
1.1.1.	Epidemiologie .....	7
1.1.2.	Pathogenese.....	9
1.2.	Therapieoptionen des Zervixkarzinoms und seines Rezidivs .....	13
1.2.1.	Operative Therapie .....	13
1.2.2.	Neoadjuvante Chemo-/Radiochemotherapie und Operation .....	16
1.2.3.	Radio-/Radiochemotherapie bei fortgeschrittenen Tumoren .....	17
1.3.	Targeted Therapie bei malignen Tumoren.....	18
1.3.1.	Allgemeine Prinzipien .....	18
1.3.2.	Therapeutisch relevante Moleküle .....	19
1.3.3.	EGFR.....	20
1.3.4.	HER-2 .....	21
1.3.5.	Cyclooxygenase-2 (COX-2) .....	22
1.4.	Nachweismöglichkeiten therapierelevanter Moleküle .....	23
1.4.1.	Immunhistochemie.....	23
1.4.2.	In-situ-Hybridisierung .....	23
1.5.	Technik der Tissue Microarrays (TMA).....	24
1.5.1.	Erläuterung Tissue Microarray .....	25
1.5.2.	Tissue Microarray-Typen .....	26
<b>2.</b>	<b>Aufgabenstellung .....</b>	<b>27</b>
<b>3.</b>	<b>Material und Methoden.....</b>	<b>28</b>
3.1.	Patientinnenkohorte .....	28
3.2.	Material .....	29
3.2.1.	Chemikalien .....	29
3.2.2.	Antikörper .....	31
3.2.3.	Herstellungsverfahren der Pufferlösungen .....	32
3.3.	Gewebeproben .....	32

3.4.	Methoden.....	33
3.4.1.	Technik der Herstellung der Tissue Microarrays (TMA'S) .....	33
3.4.2.	Immunhistochemie.....	36
3.4.3.	Auswertung der immunhistochemisch gefärbten Präparate .....	42
3.4.4.	Statistik .....	43
<b>4.</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>44</b>
4.1.	LEER- und TMMR-operierte Zervixkarzinome .....	44
4.1.1.	Histologische Patientinnencharakteristika .....	44
4.1.2.	Auswertung der immunhistochemischen Färbung .....	45
4.1.3.	Korrelation von EGFR-, HER-2- und COX-2-Expression mit der Therapiemethode.....	47
4.1.4.	Therapiemethoden in Abhängigkeit von der Tumorausdehnung	50
4.1.5.	Beziehung zwischen EGFR-, HER-2 und COX-2-Expression und pT-Stadium .....	51
4.2.	Deskription der Rezidivhäufigkeit.....	53
4.2.1.	Rezidivaufreten bei den LEER- und TMMR-operierten Tumoren.....	53
4.2.2.	Zusammenhang zwischen OP-Datum und Auftreten eines Rezidivs .....	54
4.2.3.	Relation von Rezidiven und Invasionsmuster, Desmoplasie, peritumorale Entzündung, Lymphbahneinbrüchen und dem immunhistologischen Nachweis der EGFR-, HER-2- und COX-2- Färbung.....	54
4.3.	Überlebensanalyse .....	57
4.4.	Peritumorale Entzündungsreaktion.....	58
<b>5.</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>61</b>
5.1.	Vor- und Nachteile der TMA's.....	61
5.1.1.	Vorteile der TMA's .....	61
5.1.2.	Nachteile der TMA's .....	62
5.2.	Altersverteilung .....	63
5.3.	Deskription der Tumorfärbung .....	63

5.4.	Vergleich der EGFR-, HER-2 und COX-2-Expression mit den TMMR- und LEER-operierten Zervixkarzinomen .....	65
5.4.1.	EGFR-Expression bei den primären und rezidierten Zervixkarzinomen.....	65
5.4.2.	Korrelation von HER-2-Expression mit den primären und rezidierten Zervixkarzinomen .....	67
5.5.	TMMR- und LEER-Methoden in Abhängigkeit von der Tumorausdehnung .....	72
5.5.1.	Beziehung zwischen EGFR-Expression und Tumorklassifikation	72
5.5.2.	Beziehung zwischen HER-2-Expression und Tumorklassifikation .....	73
5.5.3.	Beziehung zwischen COX-2-Expression und Tumorklassifikation .....	75
5.6.	Vergleich der Rezidive mit Invasionsmuster, Desmoplasie, peritumoraler Entzündung, Lymphbahneinbrüchen, EGFR-, COX-2- und HER-2-Färbung.....	76
5.7.	Überlebensanalyse .....	77
5.7.1.	Prognostische Relevanz der EGFR-Expressionsrate .....	78
5.7.2.	Prognostische Relevanz der HER-2-Expressionsrate .....	81
5.7.3.	Prognostische Relevanz der COX-2- Expressionsrate .....	83
5.8.	Peritumorale Entzündungsreaktion.....	84
<b>6.</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>86</b>
<b>7.</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>89</b>
<b>8.</b>	<b>Danksagung.....</b>	<b>109</b>
<b>9.</b>	<b>Eidesstaatliche Erklärung.....</b>	<b>110</b>
<b>10.</b>	<b>Lebenslauf .....</b>	<b>111</b>

# **1. Einleitung**

## **1.1. Epidemiologie und Pathogenese des Zervixkarzinoms**

### **1.1.1. Epidemiologie**

Das Zervixkarzinom ist global betrachtet mit schätzungsweise 0,5 Millionen Neuerkrankungen pro Jahr (Man und Fiander 2001) und 3.800 Todesfällen sowie etwa 11.000 Neuerkrankungen im Jahr 2008 in den USA der zweithäufigste maligne Tumor der Frau und stellt somit ein nicht zu unterschätzendes Gesundheitsproblem dar (Jemal et al. 2008, von Knebel Doeberitz 2001).

Die Inzidenzen variieren geographisch und sind Schwankungen von 5 (Spanien) und 45 (Kolumbien) pro 100.000 Frauen per anno unterworfen. Nach dem Mammakarzinom ist das Zervixkarzinom bei Frauen zwischen dem 25. und 35. Lebensjahr weltweit die häufigste Todesursache (Fischer et al. 2001).

Obwohl die Einführung von Screeningprogrammen in den Industrieländern während der vergangenen Jahrzehnte sowohl die Inzidenz- als auch die Mortalitätsrate deutlich verringern konnte, ist das Zervixkarzinom vor allem in den Entwicklungsländern nach wie vor als häufigste bösartige Neubildung zu verzeichnen (Dachdokumentation des RKI 2007, Kapp und Giaccia 1996, Man und Fiander 2001). Diese Differenzen beruhen auf unterschiedlicher Realisierung von Massenscreeningprogrammen, verschiedenen Risikofaktorenraten in den jeweiligen Populationen sowie eventuellen Erfassungsdefiziten und nicht zuletzt auf der Kostenintensität (Gatta et al. 1998, Benedet 2000, Man und Fiander 2001).

In den Ländern der EU wird bei circa 33.500 Frauen jährlich ein Zervixkarzinom diagnostiziert, wobei fast 15.000 daran versterben – das sind rund 40 Todesfälle pro Tag (Deutsches Grünes Kreuz, 2008). Die 5-Jahres-Überlebensrate beträgt trotz sehr guter medizinischer Betreuung in den Industrieländern nur 58% (Man und Fiander 2001).

In Deutschland beträgt das mittlere Alter bei der Diagnosestellung 50,4 Lebensjahre und hat sich in den letzten 25 Jahren um 14 Jahre verringert

(Angel et al. 1999). Somit liegt das Zervixkarzinom circa 19 Jahre unter dem mittleren Erkrankungsalter für alle Tumorerkrankungen. Die Altersverteilung zeigt einen ersten größeren Gipfel zwischen 35 und 39 Jahren, einen zweiten kleineren zwischen 60 und 64 Jahren (Dachdokumentation des RKI 2007). Die Anzahl der Neuerkrankungen in Deutschland ist in den letzten 13 Jahren von 20,5 auf 16,5/105 gesunken und auch bei der Mortalität wurde ein Rückgang von 7,8 auf 6,1 registriert, gemessen an den Zahlen des Saarlandes. Im Vergleich dazu liegt jedoch die Inzidenz der zervikalen Präkanzerosen um das 100-fache höher und hat vor allem bei Frauen in der Altersgruppe zwischen 21 und 30 Jahren signifikant um das 4-fache zugenommen (Blohmer et al. 1999, Kainz et al. 1995).

Mit etwa 6.500 jährlichen Neuerkrankungen und 1.660 Todesfällen im Jahre 2004 liegt die Bundesrepublik Deutschland, trotz eines etablierten gesetzlichen Früherkennungsprogrammes, im europäischen Vergleich im Mittelfeld hinsichtlich Inzidenz und Mortalität des invasiven Zervixkarzinoms (Dachdokumentation des RKI 2007, Statistisches Bundesamt für die Bundesrepublik Deutschland, 2005). Dies kann darauf zurückzuführen sein, dass die Frauen weder über die Erkrankung selbst noch über die Risikofaktoren und Präventionsmöglichkeiten ausreichend aufgeklärt werden, und sich somit der Gefahr, an Gebärmutterhalskrebs zu erkranken, nicht bewusst sind. Denn derzeit nimmt laut dem Deutschen Grünen Kreuz nur jede zweite Frau ab 20 Jahren deutschlandweit die kostenfreie jährliche Vorsorgeuntersuchung wahr, auch weltweit nehmen vor allem ältere und sozial benachteiligte Frauen nur mangelhaft oder unregelmäßig an dieser Krebsvorsorgeuntersuchung teil (NIH 1997, Stenkvist und Soderstrom 1996, MacGregor et al. 1994, Parazzini et al. 1990).

Dabei hängt die Prognose des Zervixkarzinoms wesentlich vom Zeitpunkt seiner Entdeckung ab und somit haben Vorsorgemaßnahmen bei kaum einer anderen Krebsart einen so hohen Stellenwert, denn im Frühstadium liegen die Heilungschancen bei nahezu 100 Prozent (Schenck 2000, NIH 1997, Noller 1996, Soost et al. 1989). Des Weiteren sind als zusätzliche



Präventivmaßnahmen Impfstoffe und ergänzende Screeningverfahren auf dem Markt erschienen.

Als häufigste histologische Typen sind das verhornende sowie das nicht verhornende Plattenepithelkarzinom (80%), das Adeno – oder adenosquamöse Karzinom (20%) zu beobachten. Dabei hat sich allerdings der Anteil der Adenokarzinome zu 10 auf 20% in den letzten 25 Jahren erhöht (Tattersall et al. 1995).

In der Regel gehen jedem Karzinom der Cervix uteri Präkanzerosen in Form intraepithelialer Neoplasien voraus. Symptome treten erst in späteren Stadien, vor allem ab der Tumorulzeration, auf und können sich durch unregelmäßige, zyklusunabhängige vaginale Blutungen, Kontaktblutungen, gelblich-bräunlichem Fluor vaginalis sowie Harnabflussstörungen äußern (Richter 2005).

### **1.1.2. Pathogenese**

Zahlreiche klinisch-epidemiologische Studien implizierten verschiedene Risikofaktoren für die Ätiopathogenese des Karzinoms der Cervix uteri.

Hierbei kommt vor allem den exogenen Faktoren wie Sexualverhalten, Tabakkonsum, Virusgenese, hormonale Kontrazeption sowie ein niedriger sozioökonomischer Status, eine hohe Bedeutung zu (Fu und Reagan 1989).

Es gilt heute als gesichert, dass Infektionen mit dem humanen Papillomavirus (HPV) und dadurch bedingte zervikale intraepitheliale Neoplasien (CIN) als Hauptrisikofaktoren an der Entstehung eines Zervixkarzinomes beteiligt sind (Man und Fiander 2001, Ho et al. 1998).

Da jedoch zwischen 50 und 80 Prozent aller Menschen im Laufe ihres Lebens mit dem humanen Papillomavirus in Kontakt kommen, sich die Erkrankung aber nur bei einem geringen Prozentsatz der Betroffenen auf die Gesundheit ernsthaft auswirkt, indem das Immunsystem es innerhalb von acht bis zwölf Monaten nicht schafft, die Viren zu eliminieren, scheinen individuelle Unterschiede im Immunsystem der Infizierten eine Rolle zu spielen und es muss weiterhin zusätzliche Kofaktoren geben, die das individuelle Risiko beeinflussen.

Bei Patientinnen mit einer Immunsuppression konnte insbesondere ein Anstieg der HPV-assoziierten Erkrankungen nachgewiesen werden (Stanley et al. 2001, Benton und Arends 1996).

Mittlerweile gilt als gesichert, dass die zelluläre Immunantwort essentiell in die Elimination viraler Infektionen involviert ist, wobei den zytotoxischen T-Zellen eine besondere Bedeutung zukommt (Man und Fiander 2001, Stanley et al. 2001).

Bei Frauen mit präinvasiven zervikalen Neoplasien, insbesondere CIN III, werden in etwa 30 % der Fälle spontane Remissionen beobachtet (Man und Fiander 2001).

#### **1.1.2.1. HPV-Infektion**

Mittlerweile ist weltweit anerkannt, dass die Entwicklung von hochgradigen CIN und invasiven Zervixkarzinomen eng assoziiert ist mit HPV-„high-risk“-Infektionen (Herrington et al. 1999). Die Prävalenz solcher Infektionen, welche hauptsächlich transiente Verläufe hervorrufen, variiert zwischen 20 und 40 Prozent (Ho et al. 1998, Burk et al. 1996, Evander et al. 1995).

HPV - Infektionen sind fast eine zwangsläufige Konsequenz sexueller Kontakte und gelten somit als notwendiger Risikofaktor, das heißt ohne eine persistierende Infektion mit HR-HPV entsteht kein Zervixkarzinom (Benedet und Cabero-Roura 2002, Schneider et al. 1999, Munoz 1997, NIH 1997). Selbst dann müssen die Viren im Schnitt 10 Jahre in den Zellen verweilen, bis es bei circa 30% der CIN II und CIN III zu einer Entartung in Form eines Zervixkarzinomes kommt (Man und Fiander 2001). Der Zeitraum zwischen der Infektion und dem ersten Auftreten von Läsionen kann von Wochen bis zu Monaten variieren (Stanley et al. 2001, Oriel 2000, Koutsky et al. 1992). Die Virus-DNA von „high-risk“-HPV-Typen lässt sich bei 99,7 Prozent aller Patientinnen mit einem Zervixkarzinom in den Tumorzellen nachweisen (Herrington et al. 1999, Walboomers et al. 1999) und es sind circa 130 verschiedene HPV-Typen bekannt (de Villiers 1997). Die „high risk –Läsionen“ werden in Form von hochgradigen Dysplasien und Karzinomen von den HPV-

Typen 16, 18, 26, 39, 45, 56, 58, 59, 68 und 73 induziert (Man und Fiander 2001, Stanley et al. 2001, Ho et al. 1998,), wobei jedoch vor allem das HPV 18 die Entstehung von Adenokarzinomen begünstigen soll (Madeleine et al. 2001). Den Typen 16 und 18 wird die stärkste Assoziation zum Zervixkarzinom zugeschrieben (Ho et al. 1998, Bosch et al. 1995). Die Gruppe der „intermediate risk“-HPV ist mit hochgradigen (CIN III) Dysplasien, aber nur sehr selten mit invasiven Karzinomen assoziiert und beinhaltet die Typen 31, 33, 35, 51 und 52 (Man und Fiander 2001). Die „low risk“-HPV-Typen 6, 11, 42, 43 und 44 wurden überwiegend in benignen, gering- (CIN I) oder mäßiggradigen (CIN II) Dysplasien sowie in Läsionen bei produktiver HPV-Infektion nachgewiesen (Man und Fiander 2001, Santos et al. 2001, Stanley et al. 2001, Munoz 1997, NIH 1997, Schiffmann und Brinton 1995).

#### **1.1.2.2. Sozio-ökonomischer Status**

Ein niedriger sozio-ökonomischer Status als Risikoindikator ist gekennzeichnet durch eine niedrige Bildung, bzw. berufliche Qualifikation, geringes Einkommen und Multiparität. Vor allem dem Bildungsstand wird eine besonders große Bedeutung als Risikofaktor für die Entstehung von Zervixkarzinomen beigemessen (Dachdokumentation des RKI 2007).

Das steigende Risiko einer Erkrankung mit Anzahl der Graviditäten im Sinne einer Multiparität sowie ein sehr junges Alter bei der ersten Schwangerschaft als Indiz für einen niedrigen Lebensstandard und armutsbedingten Kofaktor zu betrachten erweist sich jedoch als schwierig. Denn dieser Parameter kann schwer unabhängig von möglichen Kovariablen wie schlechte Nutrition, Nikotin- und Alkoholabusus und Genitalinfektionen betrachtet werden (Schneider et al. 1999, Ho et al. 1998, Schiffman und Brinton 1995).

#### **1.1.2.3. Sexualverhalten und Geschlechtserkrankungen**

Eine Rolle bei der Pathogenese dieser Erkrankung spielt ein frühzeitig aufgenommenes Sexualleben mit hoher Promiskuität, oft einhergehend mit häufigen Infekten, im Genitalbereich (Richter 2005, Roschlau 2003, Schneider

et al. 1999, Fischer 1998, Ho et al. 1998, Schiffman und Brinton 1995). Diese können auch unter anderem mit mangelnder Intimhygiene, auch der des Partners, in Verbindung gebracht werden. Der Sexualpartner stellt somit zusätzlich einen Überträger des karzinogenen Agens HPV dar. So belegen verschiedene Studien ein erhöhtes Risiko für Frauen, deren Partner eine hohe Promiskuität aufwies (Ho et al. 1998) oder der früher mit einer Zervixkarzinompatientin verheiratet war oder der gar selbst an einem Peniskarzinom erkrankt ist (Roschlau 2003).

Eine zusätzliche Infektion im Genitalbereich mit anderen sexuell übertragbaren Erregern wie Herpes simplex oder Chlamydien kann die Karzinomentstehung durch eine Erhöhung der Rezeptivität gegenüber „high-risk“-HPV begünstigen (Richter 2005, Roschlau 2003, Fischer 1998).

#### **1.1.2.4. Hormonale Kontrazeption**

Fast alle Publikationen beschreiben eine Assoziation der Einnahme von hormonalen Kontrazeptiva mit einem erhöhten Risiko an Entartungen des Plattenepithels der Cervix uteri, vor allem bei langzeitiger Einnahmedauer (Roschlau 2003, Madeleine et al. 2001, Santos et al. 2001, Fischer 1998). Vermutlich wird hier vor allem die Entstehung von Adenokarzinomen begünstigt (Madeleine et al. 2001, Schneider et al. 1999, Schiffman und Brinton 1995).

Die Einnahme oraler Kontrazeptiva per se stellt jedoch keine Risikoerhöhung dar, ist aber häufig eng assoziiert mit einer erhöhten sexuellen Aktivität und den damit in Verbindung stehenden Risikofaktoren, insbesondere einer HPV-Infektion, sodass die Kontrazeption als Confoundingfaktor betrachtet werden muss (Roschlau 2003).

Da jedoch Patientinnen, die hormonale Kontrazeptiva einnehmen, meist im Rahmen des regelmäßigen, routinemäßigen, jährlichen recalls gescreent werden, relativiert sich das Risiko, an einem invasiven Karzinom zu erkranken (Roschlau 2003).

#### **1.1.2.5. Tabakkonsum**

Nikotinabusus gilt als Begleitfaktor für die Entstehung eines Zervixkarzinomes, und somit ist bei Raucherinnen das Risiko einer Erkrankung im Vergleich zu Nichtraucherinnen um 60 Prozent erhöht (Roschlau 2003, Santos et al. 2001, Schneider et al 1999, Fischer 1998). Diese Wahrscheinlichkeit steigt, je früher Frauen mit dem Rauchen beginnen und je mehr Zigaretten sie pro Tag konsumieren (Köhler et al. 1994). Durch vor allem chronischen Nikotinabusus ist die Immunabwehr herabgesetzt, begünstigt durch eine Nutrition mit unzureichender Vitaminzufuhr- und es lassen sich die kanzerogene Abbauprodukte von Tabakrauch vermehrt in der Zervixmukosa und im Zervixsekret nachweisen (Fischer 1998, Ho et al. 1998).

### **1.2. Therapieoptionen des Zervixkarzinoms und seines Rezidivs**

Die Entscheidung über eine adäquate Therapiemodalität ist abhängig vom FIGO – Stadium, wobei in den Frühstadien und vor allem bei prämenopausalen Patientinnen in der Regel die Operation favorisiert wird. Gleichwertige Langzeitergebnisse bei differentem Rezidivmuster und Therapie-Nebenwirkungsprofil werden in den Stadien Ib und II mit einer Operation und Radiatio bzw. mit simultaner Radiochemotherapie erreicht (Landoni et. al 1997). Die Indikation zur primären Radiatio, vorzugsweise in Form einer simultanen Radiochemotherapie, wird im Stadium III gestellt, beim Stadium IV empfiehlt sich, die Therapieart individuell zu wählen.

#### **1.2.1. Operative Therapie**

##### Konisation

Auf diese Therapiemethode soll an dieser Stelle nicht weiter eingegangen werden, da in der vorliegenden Arbeit nur fortgeschrittene Tumoren in höheren TNM-Stadien bewertet worden sind.

#### Abdominelle Radikaloperation:

Hier erfolgt stadienabhängig die Durchführung nach Wertheim, Meigs, Latzko, Okabayashi u.a.. Das Grundprinzip dieser Operationstechnik, die aktuell noch als Standard gilt, ist das Belassen der Ovarien bei prämenopausalen Patientinnen.

In aller Ausführlichkeit werden diese sowie die folgenden Operationsmethoden in den AGO-Leitlinien ([www.ago-online.de](http://www.ago-online.de)) erläutert.

#### Vaginale Radikaloperation nach Schauta-Amreich/ radikale Trachelektomie:

Diese beiden Operationstechniken stellen eine methodische Alternative zur abdominalen Verfahrensweise dar. Bei der Trachelektomie können der Uterus und damit die Fertilität erhalten werden (Dargent et al. 2000).

#### Lymphadenektomie:

Der oben genannte Eingriff wird durch die systematische pelvine Lymphadenektomie oder durch eine para-aortale Lymphadenektomie komplettiert.

#### Primäre Exenteration:

Hierzu sind aktuell aufgrund fehlender Studien noch keine hinreichenden Aussagen möglich. Dennoch kann diese Operationsart, um beispielsweise eine Kloakenbildung zu vermeiden, auch in der Primärsituation vorgenommen werden, sofern die Indikation dafür gestellt ist.

#### Sekundäre Exenteration:

Mit dieser Therapieart beträgt die Wahrscheinlichkeit des Langzeitüberlebens ca. 30-50%. Sie kann beim Vorliegen eines zentralen Rezidivs bei fehlender Fernmetastasierung nach vorher erfolgter Behandlung wie Operation, Radiatio oder auch Radiochemotherapie durchgeführt werden. Gegebenenfalls kann in Abhängigkeit von der Lokalisation des Tumors, z.B. bei Blasenbefall, eine vordere und z.B. bei Rektumbefall eine hintere Exenteration von Nöten sein. Sollte eine Tumordinvasion in beide Organe stattgefunden haben, ist eine

vollständige Exenteration erforderlich, wobei zusätzlich die Rekonstruktion der Harnableitung sowie des Beckenbodens vorgenommen werden muss. Die oben genannten Eingriffe sollten ebenso wie die Operation des Beckenwandrezidivs nur in entsprechend ausgestatteten, spezialisierten Zentren erfolgen (Höckel et al. 2001).

#### Totale mesometriale Resektion (TMMR):

Mit diesem neuen, innovativen Operationskonzept wird radikal gegen den Tumor, aber schonend gegenüber der Patientin vorgegangen.

Die TMMR ist charakterisiert durch

- eine en-bloc-Resektion des Uterus, der proximalen Vagina sowie des Mesometriums als einer aus der Embryonal- und Fetalentwicklung abgeleiteten Gewebeeinheit
- das Absetzen der rektouterinen subperitonealen Bindegewebsverdichtungen unmittelbar oberhalb des freigelegten Plexus hypogastricus inferior
- die erweiterte pelvine/ paraaortale Dissektion der Lymphknoten unter Erhaltung des Plexus hypogastricus inferior (Höckel 2003)

Die Methode beruht auf Erkenntnissen aus der Embryonalentwicklung, denn Karzinome breiten sich über eine verhältnismäßig lange Phase ihrer Existenz nur innerhalb eines festgelegten Gewebe-Kompartiments aus. Jene morphogenetische Einheit schließt ihre spezifischen neurovaskulären Versorgungs- und Fixationsstrukturen ein. Zunächst findet keine Tumordinvasion in sich in unmittelbarer Nachbarschaft befindlichen Gewebe anderen embryonalen Ursprungs, wie z.B. in die Blase, statt.

Bei der TMMR wird die vom Karzinom infiltrierte morphologische Einheit bzw. das Segment dieses Kompartimentes vollständig reseziert, wobei mit minimalem operativem Trauma benachbarte Strukturen anderer Embryogenese trotz ihrer engen räumlichen Beziehung erhalten werden können. Dies führt zur maximalen Tumorkontrolle bei einer geringen behandlungsbedingten Morbidität und somit kann eine Verbesserung des therapeutischen Index erzielt werden.

Bei vollständiger Destruktion der morphogenetischen Einheit durch das Karzinom oder auch in Folge posttherapeutischer Narben kann der Tumor im Falle einer lokal fortgeschrittenen Erkrankung oder eines Rezidivs die Grenzen des embryonalen Kompartiments überschreiten. Dann müssen jedoch die benachbarten viszeralen und parietalen Kompartimente zur Tumorexzision mit dem Ziel der lokalen Kontrolle einbezogen werden (Dornhöfer & Höckel 2008, Böing & Kimmig 2007).

Die TMMR wird vor allem angewendet in den Stadien FIGO IB-IIB beim Zervixkarzinom (Höckel 2005, Höckel 2003).

#### Lateral erweiterte endopelvine Resektion (LEER):

Diese Methodik stellt die totale, vordere, hintere bzw. abdominale und abdominoperineale erweiterte Beckenexenteration en bloc dar, es werden die Beckenwand- und Beckenbodenmuskulatur sowie das Iliaca interna-Gefäßsystem und ebenso die Lymphknoten therapeutisch mitreseziert. Anschließend findet eine angepasste pelvine Rekonstruktion bzw. suprapelvine Substitution der Organfunktionen zur Behandlung von lokal fortgeschrittenen und rezidivierenden Karzinomen mit anschließender Beckenwandfixation statt. Allerdings ist die LEER bei Fernmetastasen oder engem Bezug zum Foramen ischiadicum kontraindiziert. Die Heilungschancen können durch Radiochemotherapie auf über 50% erhöht werden, die 5-Jahresüberlebenswahrscheinlichkeit beträgt hier in der Regel jedoch weniger als 50% (Höckel 2003).

#### **1.2.2. Neoadjuvante Chemo-/Radiochemotherapie und Operation**

Die Chemotherapie erweist sich im Falle des Zervixkarzinomes effizient bei Adeno- sowie Plattenepithelkarzinomen. Hierbei eignen sich besonders Cisplatin, Carboplatin sowie Ifosfamid, wobei auch eine Kombination mit Anthracyclinen, Mitomycin, Bleomycin oder auch Taxanen möglich ist. Es konnte eine kurative Wirkung der Chemotherapie jedoch nur im



Zusammenhang einer gleichzeitig erfolgten Radiatio bewiesen werden (Hänsen et al. 2002, Pearcey et al. 2002, Green et al. 2001, Peters et al. 2000, Roberts et al. 2000, Keys et al. 1999, Morris et al. 1999).

Gute Remissionserfolge von etwa 36-50%, zum Teil auch komplette Remissionen sind bei Rezidiven oder auch bei Fernmetastasen durch zytostatische Kombinationstherapien zu verzeichnen. Hierbei beträgt die mittlere Überlebenszeit sieben bis zehn, die mediane progressionsfreie Zeit vier bis sechs Monate. Wenn vorher eine Bestrahlung erfolgte, war eine geringere Wirkung feststellbar (Benedetti-Panici et al. 2002, Chang et al. 2000, Shueng et al. 1998).

### **1.2.3. Radio-/Radiochemotherapie bei fortgeschrittenen Tumoren**

#### Primäre Radiatio oder Radiochemotherapie:

Die Kombination von intrakavitärer Kontaktbestrahlung mit perkutaner Hochvoltbestrahlung stellt in der Regel die primäre Radiotherapie dar. Es zeigte sich jedoch eine deutliche Erhöhung der Heilungschancen bei zusätzlicher Anwendung einer gleichzeitigen Cisplatin-haltigen Chemotherapie.

Erwähnenswert ist, dass bei einer Kombinationschemotherapie keine besseren Ergebnisse gegenüber einer Monotherapie mit Cisplatin nachweisbar waren. Neben Cisplatin ist Carboplatin existent, wobei hier jedoch der wissenschaftliche Nachweis fehlt und zusätzlich wird Carboplatin eine Myelotoxizität nachgesagt (Hänsen et al. 2002, Green et al. 2001, Peters et al. 2000).

Eine besondere Bedeutung kommt in der Primärtherapie der lokalen Kontakttherapie zu. Denn anatomisch bedingt ist hier eine Konzentrierung einer hohen Strahlendosis nur auf das Karzinom erzielbar, wobei umgebende Strukturen wie Blase, Ureteren und Rektum nur geringfügig strahlenbelastet werden (Petereit et al. 1999).

### Postoperative Radiotherapie oder kombinierte Radio-/ Chemotherapie:

Die Indikation zur postoperativen Radiotherapie wird gestellt aus der Kombination diverser Prognosefaktoren, wie z.B. Befall des lymphovaskulären Raumes, Lymphadenektomie, Tumorgröße sowie tiefer Stromainvasion (Schmid et al. 2001).

Die postoperative Radiochemotherapie kann zu einer Verbesserung der Überlebensraten führen (Hänsgen et al. 2002, Blohmer et al. 2001, Peters et al. 2000).

## **1.3. Targeted Therapie bei malignen Tumoren**

### **1.3.1. Allgemeine Prinzipien**

Das Prinzip der targeted therapy ist, besondere charakteristische Merkmale und Eigenschaften lediglich der Tumor- und nicht der gesunden Körperzellen zu identifizieren und diese gezielt medikamentös zu bekämpfen unter Schonung der gesunden Zellen. In der Regel werden hierbei mutierte Tumorzellen mit meist gentechnisch hergestellten monoklonalen Antikörpern („-mab“) oder sogenannten small molecules („-mib“ oder „-nib“) angegriffen.

Um für jeden Patienten eine möglichst individuelle und gezielte Therapie auszuwählen, wird aus einer der Patientin entnommenen Biopsie ein „genetischer Fingerabdruck“ erstellt, um sodann ein individualisiertes Medikament herzustellen. Aktuell werden stetig neue Methoden und Therapieoptionen, vor allem auf den Gebieten der Biomedizin, Gen- und Zelltherapie, entwickelt.

Kim & Seo (2003) veröffentlichten eine vielversprechende Studie zum Einbringen des sogenannten „Selbstmordrezeptors“ TRAIL in die Tumorzellen zur Induktion der Apoptose, wobei dafür jedoch noch eine effektive Methode für diesen Gentransfer entwickelt werden muss.

Therapiekonzepte zur Bekämpfung von Rezidiven stehen noch in den Kinderschuhen, dennoch scheinen nach neueren Theorien die Tumorstammzellen für Rezidive verantwortlich zu sein (Elric et al. 2005).

### **1.3.2. Therapeutisch relevante Moleküle**

#### Rezeptorbasierte Therapie:

Trastuzumab wirkt gegen den sich auf Mamma- und Pankreaskarzinomen, aber auch auf diversen anderen Tumoren befindlichen Rezeptor Her2/ neu (Bayo-Calero et al. 2008, Nishimura et al. 2008, Storniolo et al. 2008, Dowsett et al. 2007, Tapia et al. 2007).

Cetuximab ist ein therapeutischer chimärer monoklonaler Antikörper vom Typ IgG1 und wird zur Bekämpfung von Kolorektalkarzinomen, aber auch von Tumoren des Kopf-Hals-Bereiches, eingesetzt, indem er den EGF-Rezeptor angreift (Lelli et al. 2008, Ramalingam et al. 2008, Thalheimer et al. 2008, Vincenzi et al. 2008, Aerts et al. 2007, Jonker et al. 2007).

Panitumumab, bzw. ABX-EGF bindet ebenso an den EGF-Rezeptor und ist ein humaner monoklonaler Antikörper aus Immunglobulingruppe (IgG2κ). Seine therapeutische Zielstruktur entspricht der des Cetuximabs (Rehder et al. 2008, Weiner et al. 2008, Giusti et al. 2007, Hecht et al. 2007, Lopez-Albaitero et al. 2007).

#### Inhibition von Stoffwechselwegen und Wachstumshinderung mittels „small molecules“:

Imatinib richtet sich als ein Inhibitor der Tyrosinkinase gegen Tumoren der Cervix uteri, CML sowie GIST-Tumoren (Kummel et al. 2008, Larson et al. 2008, Sym et al. 2008, Nilsson et al. 2007).

Gefitinib, ebenso ein Tyrosinkinase-Inhibitor, wird zur Behandlung von Lungenkarzinomen eingesetzt (Parikh et al. 2008, Ramalingam et al. 2008, Sequist et al. 2008, Cragg et al. 2007, D'Addario et al. 2007).

Bortezomib induziert als Proteasom-Inhibitor in der Therapie des Multiplen Myeloms in Tumorzellen die Apoptose (Conner et al. 2008, Wong et al. 2008, Mulligan et al. 2007).

Immucillin-H, ein Inhibitor der Purin-Nukleosid-Phosphorylase (PNP), wird momentan in klinischen Tests zur Behandlung von akuten lymphatischen Leukämien (ALL) erprobt (Gandhi et al. 2005).

Erlotinib ist als selektiver Inhibitor der Tyrosinkinase-Domäne des EGFR seit 2005 gegen das nicht-kleinzellige Bronchialkarzinom und seit 2007 gegen das Pankreaskarzinom zugelassen (Li et al. 2008, Spigel et al. 2008, Moore et al. 2007, Giaccone et al. 2006, Iannitti et al. 2005).

#### Antiangiogenese:

Währenddessen die Angiogenese im gesunden Körper relativ selten vorkommt, so ist sie vor allem bei malignen Tumoren zur Nährstoff- und Sauerstoffversorgung zu finden. Mediatoren wie VEGF, welche die Angiogenese induzieren, können mit Bevacizumab angegriffen werden, Willet et al. (2005) konnten damit erste Erfolge bei Darmtumoren verzeichnen.

#### **1.3.3. EGFR**

Dieser Rezeptor für den Epidermal-Growth-Factor (EGF) ist der ErbB-Familie zugehörig, welche eine Unterfamilie von vier eng verwandten Rezeptor-Tyrosinkinasen, explizit EGFR1/HER1 (ErbB-1), HER2/c-neu (ErbB-2), HER3 (ErbB-3) sowie HER4 (ErbB-4), darstellt.

Der EGFR ist ein Transmembranrezeptor mit intrinsischer Tyrosinkinase-Aktivität. Durch extrazelluläre Bindung der Liganden Epidermal Growth Factor (EGF) und Transforming Growth Factor (TGF $\alpha$ ) wird der EGFR aktiviert. Er leitet dessen Signal über Autophosphorylierung und über die Rekrutierung von Signalmolekülen wie Akt/PKB, MEK oder STAT in das Innere der Zellen im Sinne einer Signaltransduktion, welche schlussendlich das Zellwachstum stimulieren und den apoptotischen Zelluntergang inhibieren. Subsummierend

stellt der EGF-Rezeptor einen bedeutenden Rezeptor für Wachstumsfaktoren dar.

Eine Inhibition des oben genannten Rezeptor-Liganden-Komplexes kann durch  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  erfolgen, worauf sich beispielsweise die Wirksamkeit des Vitamin D in der Therapie der Psoriasis begründet, denn psoriatische Zellen synthetisieren vermehrt  $\text{TGF}\alpha$ . Da der EGFR in multiplen Tumoren hochreguliert wird und/ oder in mutierter Form existiert, können die Tumorzellen unkontrolliert wachsen und sich vermehren (Soto-Cruz et al. 2008). Aktuelle Tumorthapien sind gezielt darauf angesetzt, dieses onkogene Signal von EGFR zu blockieren und somit das Tumorwachstum zu unterbinden.

#### **1.3.4. HER-2**

Der human epidermal growth factor 2, auch erb-B2 oder c-erb B2 genannt, gehört zur Gruppe der epidermalen Wachstumsfaktorrezeptoren (EGFR). Er stimuliert über den RAS-MAP-Kinase-Weg die Zellproliferation und inhibiert über den mTOR-Signalweg die Apoptose (Hudis 2007).

Dieser Wachstumsfaktorrezeptor hat eine prägnante Bedeutung in der Therapie des invasiven Mammakarzinomes, bei denen in 15-30% der Fälle eine Überexpression von Her2/neu in Korrelation mit einer niedrigen Überlebensrate zu finden ist. Her2/neu-positive Patientinnen können von einer Therapie mit einem gegen den extrazellulären Anteil des Her2-neu-Rezeptor gerichteten, humanisierten Antikörper, (Trastuzumab) profitieren. Allerdings werden mögliche toxische Wirkungen auf das Herz diskutiert.

Dieser Antikörper wird vor Therapiebeginn initial mittels Immunhistochemie oder Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung auf eine Amplifikation und Überexpression des Her2/neu-Genes getestet. Die Indikation zur Antikörpertherapie gilt jedoch nur als gestellt, wenn das Ergebnis der immunhistochemischen Untersuchung des Tumorgewebes dreifach positiv, im Sinne einer eindeutigen Überexpression, ist. In Zweifelsfällen kann die FISH als Bestätigungstest fungieren (Hudis 2007).

### **1.3.5. Cyclooxygenase-2 (COX-2)**

Die COX-2 gehört ebenso wie die anderen Cyclooxygenasen zur Familie der Pathogen-Induzierbaren-Oxygenasen (PIOXs), ihre Funktion ist die Synthese von Prostaglandin- $H_2$  aus Arachidonsäure (Eichele et al. 2008, Simmons et al. 2004).

Cyclooxygenasen haften an den Membraninnenseiten des endoplasmatischen Retikulums, der Kernhülle und des Golgiapparates. Die COX-2 ist in sämtlichen Endothelzellen zu finden (proliferierende Gefäße, entzündete Gewebe und atherosklerotische Läsionen) und wird bei Entzündungsprozessen erhöht transkribiert (Samaka et al. 2006). Zusätzlich tritt sie in vielen malignen Tumorzellen gehäuft auf und es wird ihre nicht unwesentliche pathologische Bedeutung für das Wachstum von Tumoren diskutiert. Die durch die COX-2 synthetisierten Prostaglandine, vor allem  $PGE_2$ , induzieren eine Anregung der Bildung von vaskulären endothelialen Wachstumsfaktoren zur Proliferation und die Apoptoseinhibierung (Eichele et al. 2008, Shi et al. 2007, Prescott 2000, Williams 2000). Zusätzlich werden die Angiogenese und die Immunsuppression gefördert (Lee et al. 2004, Simmons et al. 2004).

Die Expression der COX-2 wird gefördert durch Entzündungsmediatoren wie  $TNF\alpha$ , Interleukin- $1\beta$  oder Lipopolysaccharide, aber auch durch Wachstumsfaktoren, Onkogene,  $NF\kappa B$  oder den MAP-Kinase-Weg. Ebenso induziert Methandamid als Analogon der Endocannabinoide die COX-2-Expression (Eichele et al. 2008, Simmons et al. 2004).

Eine Hemmung der Expression wird durch Vitamin  $K_2$  bewirkt, Dexamethason destabilisiert die mRNA der COX-2 (Plaza & Lamson et al. 2005).

Obwohl die COX-2 nicht unwesentlich an der Angiogenese beteiligt ist, kann diese jedoch bei chronischen Erkrankungen wie Rheuma oder Tumoren nicht in klinisch relevantem Ausmaß durch COX-2-Hemmer inhibiert werden (Eichele et al. 2008, Simmons et al. 2004).

## **1.4. Nachweismöglichkeiten therapierelevanter Moleküle**

### **1.4.1. Immunhistochemie**

Mittels der Immunhistochemie können Proteine mittels Antikörpern visualisiert werden. Somit können auch Gewebe oder Kompartimente, in denen die Proteine lokalisiert sind, identifiziert werden. So zum Beispiel färben die nur im Zellkern befindlichen Transkriptionsfaktoren ausschließlich den Zellkern an, Zellmembranen werden wiederum lediglich von membranständigen Proteinen angefärbt.

Die Immunhistochemie wird vorwiegend zur Identifikation und Klassifizierung von Tumorzellen, welche bestimmte Antigene exprimieren, eingesetzt. Somit ist eine Diskriminierung hinsichtlich Metastasenabsiedlung, Destruktionspotential, Therapieantwort u.a. von Tumoren möglich.

Diese bestimmten Zelleigenschaften können nunmehr mittels der targeted therapy, wie z.B. Herceptin beim Mammakarzinom, angesteuert und effizient therapiert werden.

### **1.4.2. In-situ-Hybridisierung**

Mittels dieses Verfahrens kann DNA oder auch RNA in Geweben, einzelnen Zellen oder auf Metaphase-Chromosomen nachgewiesen werden.

Am häufigsten findet die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung Verwendung, daneben existieren noch die Genomische in-situ-Hybridisierung (GISH), bei welcher als Sonde gesamt-genomische DNA eingesetzt wird, sowie die chromosomale in-situ-Suppressions-Hybridisierung (CISS), mit dieser ist die Markierung von ganzen Chromosomen möglich (Cremer et al. 1988).

#### Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH)

Hier erfolgt der Sondennachweis mittels eines fluoreszierenden Farbstoffes, wobei durch den Einsatz diverser Fluoreszenzfarbstoffe mehrere Strukturen simultan nachgewiesen werden können (Bolzer et al. 2005).

Laut Brecevic et al. (2006) wird die FISH auch zur Charakterisierung von Markerchromosomen verwendet, bei Mammakarzinomen zur Untersuchung auf eine HER2-Amplifikation ist sie mittlerweile Standard und wird bei der Untersuchung von HPV sowie ausgewählter Gene in der gynäkologischen Vorsorgezytologie angewendet (Savic et al. 2007).

Ein weiterer Einsatzbereich der FISH ist die Genomuntersuchung von Tumorzellen, um Chromosomenaberrationen zu detektieren. So z.B. können in Metaphasepräparaten chromosomale Umbauten, welche sich durch G-Bänderung nicht diagnostizieren lassen, untersucht werden.

### **1.5. Technik der Tissue Microarrays (TMA)**

Diverse Studien der letzten Jahre zeigten auf, dass eine Vielzahl unterschiedlicher Gene bei gynäkologischen Malignomen eine entscheidende Rolle in der Pathogenese, in der malignen Progression sowie bei der Metastasierung spielen (Chen et al. 2003, Kim et al. 2003, van de Rijn et al. 2002).

Für den Erfolg bzw. Misserfolg therapeutischer Maßnahmen sind eine Reihe von prädiktiven Faktoren verantwortlich, die durch Veränderungen an bestimmten, vor allem den Zellzyklus regulierenden, Genen beeinflusst werden. Dies bedeutet, dass eine möglichst exakte klinisch-pathologische sowie molekularbiologische Charakterisierung (pathologic and molecular profiling) verschiedener Tumorentitäten sowohl in der Pathogeneseforschung sowie auch unter therapeutischen Fragestellungen von Nöten ist (Al-Kushi et al 2003, Emmert-Buck et al 2000). Schockgefrorenes Gewebe ist zusätzlich neben verschiedenen in-vitro Techniken für eine Reihe von ex-vivo-Untersuchungen notwendig. Dieses Gewebe ist jedoch zumeist nur an großen, in der Regel universitären Einrichtungen vorhanden und bedeutet einen immensen zeitlichen und logistischen Aufwand. Laut Nitz und Dierks (2002) und sowie Kaulen (2003) kommen zusätzlich die vor allem in jüngster Zeit zunehmenden juristischen Diskussionen über die Eigentumsverhältnisse des Gewebematerials hinzu.



Generell kann man jedoch davon ausgehen, dass das Tumorgewebe und das dazugehörige Normalgewebe von histo-pathologischen Untersuchungen von Biopsien bzw. Operationspräparaten ausreichend vorhanden sind. Das Problem ist jedoch hierbei, dass es sich vor allem bei Probeentnahmen im Sinne von Stanz- oder Knipsbiopsien um das zum Teil einzig verfügbare Gewebematerial für die Bestimmung bzw. wissenschaftliche Untersuchung bezüglich der Bedeutung prädiktiver sowie prognostischer Faktoren und für das molecular profiling handelt.

#### **1.5.1. Erläuterung Tissue Microarray**

Eine neue Technik zur molekularen Charakterisierung von Tumoren auf Protein- (Proteomics), Zucker- (Glycomics) sowie DNA-Ebene stellen Multigewebeblöcke, sogenannte Tissue Microarrays, dar.

TMA's sind aus Paraffin bestehende Blöcke, welche Stanzbiopsien diverser Tumoren mit bekannten kliniko-pathologischen Charakteristika bzw. Informationen zum Follow-up an einer definierten Lokalisation beinhalten.

Die Idee dieser Multigewebeblöcke stammt von Battifora (1986, von Kononen et al. 1998 weiterentwickelt), mit dem Ziel der Vereinigung multipler, von verschiedensten Herkünften stammende Gewebeproben in nur einem einzigen Paraffinblock. Somit ist es möglich, eine sehr große Anzahl von Gewebeproben diverser Patientinnen effizient zu untersuchen (Horn et al. 2005).

Bei der Anwendung der sogenannten TMA's, oder auch als „tissue chips“ bezeichneten Paraffinblöcke werden eine Vielzahl von Gewebeproben diverser Patientinnen auf einen molekularen Marker getestet.

Ergebnisse dieser Technik lieferten in den vergangenen Jahren eine regelrechte Datenflut bezüglich der Überexpression bzw. der Repression von Genen in Tumoren (Chen et al. 2003, Cheng et al. 2002). Mittels der Immunhistochemie (IHC) und der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) sowie anderen in-situ-Techniken können laut Bartlett et al. (2003), Horn et al. (2001), van de Rijn & Gilks (2004) über verfügbare Antikörper und Sonden etliche der o.g. Gene, welche für Moleküle bzw. Proteine und Zucker kodieren,

in Bezug auf die Relevanz der zugrunde liegenden genetischen Alteration detektiert und getestet werden (Horn et al. 2005).

### **1.5.2. Tissue Microarray-Typen**

Es können diverse TMA-Typen hinsichtlich der in dem Block enthaltenen Gewebeart unterschieden werden:

- *Multitumor-TMA's:*  
beinhalten Proben diverser Tumorlokalisationen und histologischer Typen, um ein Screening bezüglich der Expression bestimmter Proteine durchzuführen
- *Prädiktions- bzw. Progressions-TMA's:*  
enthalten nur eine Tumorart innerhalb verschiedener, definierter Stadien zur Analyse prädiktiver bzw. progressionsbezogener Parameter
- *Prognose-TMA's:*  
hier liegen Angaben zum Follow-up vor.

## **2. Aufgabenstellung**

Die Inzidenzraten des Zervixkarzinoms sind nach der Einführung von Massenscreeningprogrammen in Europa deutlich regredient, allerdings herrscht eine relative Konstanz der 5-Jahres-Überlebensraten (Fischer 2003, Arbeitsgemeinschaft bevölkerungsbezogener Krebsregister in Deutschland 2002). Leider gibt es nach wie vor einen Anteil an Patientinnen, vorwiegend in der Altersgruppe über 55 Jahre, welche sich den angebotenen Vorsorgemaßnahmen im Sinne von Früherkennungsuntersuchungen, nicht unterziehen. Hier erfolgt häufig eine gynäkologische Konsultation erst bei auftretenden Symptomen, bzw. progredienten Beschwerden. Bei der Diagnose wird dann meist aufgrund eines fortgeschrittenen Zervixkarzinoms die Indikation zur Operation, bzw. zu einer Chemo- oder Radiochemotherapie gestellt (Sung et al. 2000).

Nicht zuletzt besteht deshalb die Notwendigkeit neuer Therapieansätze, z.B. in Form von targeted therapies. Mit diesen können charakteristische Merkmale von Tumoren identifiziert sowie gezielt und individuell angegriffen werden. So können im Karzinom überexprimierte Moleküle wie EGFR, HER-2 und COX-2 mittels monoklonalen Antikörpern, z.B. rezeptorbasiert, bekämpft werden. EGFR und HER-2 spielen als epidermale Wachstumsfaktoren eine wichtige Rolle für das Tumorwachstum, die COX-2 fungiert als Entzündungsmediator.

Ziel dieser vorliegenden Arbeit war die Charakterisierung der Expression von EGFR, HER-2 sowie COX-2 in TMMR-operierten primären Karzinomen der Cervix uteri sowie in LEER-operierten Rezidiv-Tumoren.

Eine der Fragestellungen dieser Arbeit war, wie häufig EGFR, HER-2 und COX-2 im Zervixkarzinom nachzuweisen sind. Weiterhin galt es herauszufinden, ob eine Differenz zwischen der Häufigkeit des Nachweises der o.g. Moleküle zwischen den primären, nicht vortherapierten und operierten Karzinomen der Cervix uteri und den multimodal vorbehandelten Zervixkarzinom-Rezidiven besteht.

### **3. Material und Methoden**

#### **3.1. Patientinnenkohorte**

Es sind aus dem Labor der Universitätsfrauenklinik (Triersches Institut) Leipzig sowie vom Institut für Pathologie der Universität Leipzig stammende Gewebeproben von Patientinnen, bei denen ein Zervixkarzinom diagnostiziert und klassifiziert wurde, retrospektiv untersucht worden. Klinische Daten zu den Patientinnen bei der Primärdiagnose sowie zum weiteren Krankheitsverlauf hinsichtlich eines Auftretens von Rezidiven oder Fernmetastasen, bzw. eines generellen Überlebens sind den archivierten Krankenakten entnommen worden. Die TNM-Klassifikationen sowohl des Primärtumors als auch der Lymphknoten, das Grading und Tumorinvasionsmuster sowie die Desmoplasie waren bei allen, entweder mittels der LEER oder der TMMR operierten Patientinnen bekannt. Selbiges trifft für die peritumorale Entzündung und die Lymphgefäßinvasion zu.

Die Paraffin-Gewebeschnitte wurden als Stanzbiopsien in TMA's vereinigt. Im Anschluss daran wurde die immunhistochemische Darstellung von EGFR, HER-2 sowie COX-2 durchgeführt. Als Positivkontrolle sind Gewebeschnitte anderer Herkunft, wie z.B. von der Mamma, verwendet worden. Solch eine Positivkontrolle erfolgte bei jedem Ansatz.

Zervixkarzinome, welche auch nach zweimaliger Färbungswiederholung nicht auswertbar waren, entfielen aus der Untersuchung, sodass subsummiert 73 Karzinome der Cervix uteri in die statistische Auswertung eingingen.

#### Ausschlusskriterien der Patientinnen mit einem Zervixkarzinom:

Patientinnen, die im Sinne einer Bestrahlung oder Radiochemotherapie vortherapiert worden sind, wurden aufgrund des Fehlens der pathologischen Klassifikation ebenso wie nicht mehr operable Frauen aus der Untersuchung ausgeschlossen.

#### Einschlusskriterien der Patientinnen mit einem Zervixkarzinom:

Die Zervixkarzinome sind alle an der Universitätsfrauenklinik entweder mittels der nach Höckel modifizierten Wertheim-Meigs-Operation, der sogenannten Totalen Mesometrialen Resektion (TMMR, Höckel 2003, 2005, 2007, 2009) oder mit der Lateral Erweiterten Endopelvinen Resektion (LEER, Höckel 2005, 2007) behandelt worden.

Diese o.g. Operationen sind alle in den Jahren von 1998 bis 2005 durchgeführt worden.

### **3.2. Material**

#### **3.2.1. Chemikalien**

##### Lösungen und Puffer

Die Standardchemikalien wie Lösungsmittel und Puffer wurden von den Firmen Merck (Darmstadt) und Serva (Heidelberg) sowie DAKO Cytomation (Carpinteria, USA) verwendet; zur Herstellung der Lösungen und Puffer ist destilliertes Wasser (ELGA Purelab Classic) benutzt worden.

Das vergällte Ethanol wurde von der Apotheke des Universitätsklinikum Leipzig geliefert.

##### für COX 2:

Avidin-Biotin-Blockung                      Fa. DAKO Cytomation (Carpinteria, USA),  
Katalog-Nr.: X 590

ChemMate-Detection-Kit

Peroxidase/ DAB Rabbit/ Mouse      Fa. DAKO Cytomation (Carpinteria, USA),  
Katalog-Nr.: K 5001

ChemMate™ Antibody Diluent      Fa. DAKO Cytomation (Carpinteria, USA),  
Katalog-Nr.: S 2022

Trispuffer (NaCl+TrisHCl)              Fa. Roth (Karlsruhe, Deutschland)  
Katalog-Nr. NaCl: 39571  
Katalog-Nr. TrisHCl: 9090.3

Target Retrieval Solution	Fa. DAKO Cytomation (Carpinteria, USA) Katalog-Nr.: S 3308
High pH	Fa. DAKO Cytomation (Carpinteria, USA) Katalog-Nr.: S 3308
Triton X	Fa. Serva Feinbiochemie (Heidelberg, Deutschland) Katalog-Nr.: 37238
Tween Pure	Fa. Serva Feinbiochemie (Heidelberg, Deutschland) Katalog-Nr.: 37470
Vectastain ABC Peroxidase Kit	Fa. Linaris (Wertheim-Bettingen, Deutschland) Katalog-Nr.: PK 6100
DAB	Fa. DAKO Cytomation (Carpinteria, USA) Katalog-Nr.: SK 4100
Hämatoxylin nach Harris	Fa. Dr. K. Holborn & Söhne (Leipzig, Deutschland)
Neutral-Balsam	Fa. Dr. K. Holborn & Söhne (Leipzig, Deutschland)
Objektträger geschnitten/ Mattrand	Fa. Menzel Gläser (Braunschweig, Deutschland)
PAP Pen Liquid Blocker	Fa. SCI Science Service (München, Deutschland)
SuperFrost/ Plus Objektträger	Fa. Menzel Gläser (Braunschweig, Deutschland)
Shandon Histoplast Paraffin mit einer Erstarrungstemperatur von 56°C -58°C	Fa. Shandon (Pittsburgh, USA)

für Her2/neu und EGFR zusätzlich:

Antibody Diluent                      Fa. Zytomed Systems GmbH (Berlin, Deutschland)

Katalog-Nr.: ZUC025-500

Aquatex                                  Fa. Merck (Darmstadt, Deutschland)

Citronensäuremonohydrat              Fa. Merck (Darmstadt, Deutschland)

Ethanol (verschiedene  
Konzentrationen)                      BfB Bundesmonopolverwaltung für Branntwein  
(Offenbach am Main, Deutschland)

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>                                      Fa. Merck Schuchardt OHG  
(Höhenbrunn, Deutschland)

Meyer's Häkalaun                      Fa. Merck (Darmstadt, Deutschland)

Ultravisions Plus Detection  
System, DAB Plus Substrate  
System                                  Fa. DAKO Cytomation (Carpinteria, USA)  
Katalognummer: TA-125-HDX  
Lot-Nummer: HDX 80425

### **3.2.2. Antikörper**

Hercept:                                  Fa. BioGenex (San Ramon, USA)  
Katalognummer: HI 608C01  
Lot-Nummer: E121

EGFR:                                      Fa. DAKO Cytomation (Carpinteria, USA)  
Katalognummer: M 3563  
Lot-Nummer: 00000658

COX-2 monoclonal antibody:              Maus, Anti human COX-2 Clone 194  
Fa. DAKO Cytomation (Carpinteria, USA)

Katalognummer: M 3617

Super Sensitive link-label IHC

Detection System :

Katalognummer: LP 000-ULE

Lot-Nummer: LP 0000608

Fa. BioGenex (San Ramon, USA)

mit Multi-Link antibody, biotinylierter  
Sekundär- antikörper und Streptavidin –  
Peroxidase –Nachweissystem

### **3.2.3. Herstellungsverfahren der Pufferlösungen**

Trispuffer (0,01 M Tris-NaCl pH 7,6):

Herstellung von 1 l Stammlösung:

Es wurden 175,3 g NaCl mit 78,8 g Tris-HCl in 1 l Aqua dest. gelöst und anschließend mit NaOH auf den pH 7,6 eingestellt. Nun ist diese Stammlösung mit Aqua dest. im Verhältnis 1:10 verdünnt und mit 1 ml Tween 20 versetzt worden. Die Lagerung erfolgte bei 4°C.

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Pufferbad:

Hier sind 20 ml von 30%-igem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in 200 ml Phosphatpuffer mit einem pH von 7,4 gelöst worden.

### **3.3. Gewebeproben**

Die Patientendaten und Gewebeproben wurden vom Labor der Universitätsfrauenklinik (Triersches Institut) Leipzig sowie vom Institut für Pathologie der Universität Leipzig zur Verfügung gestellt.



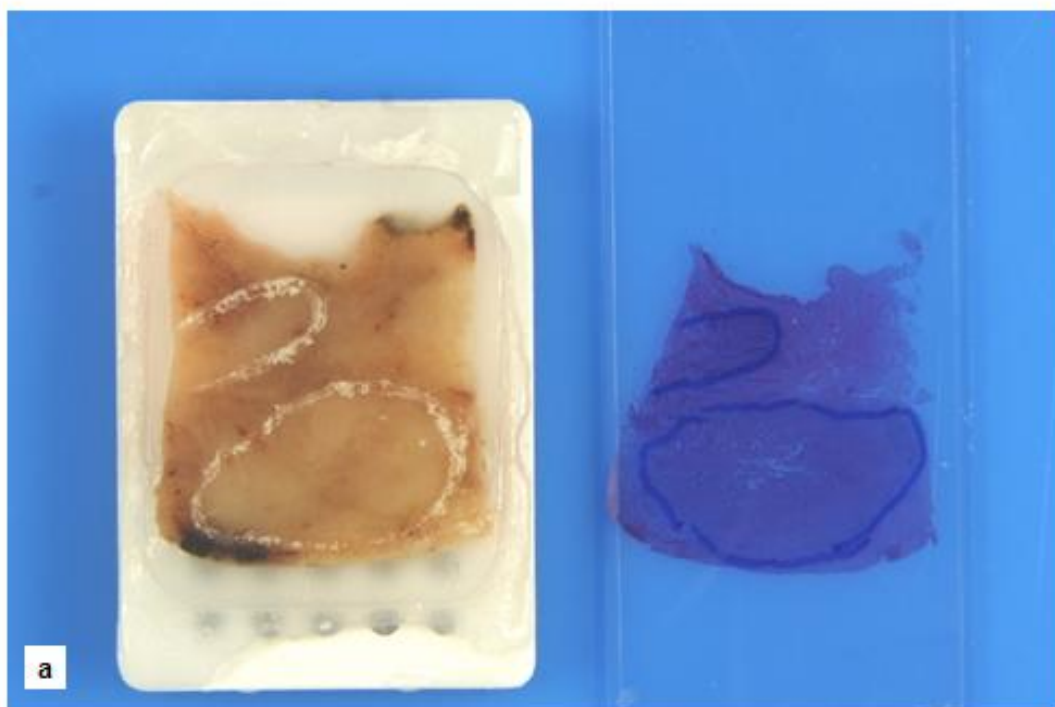
### 3.4. Methoden

#### 3.4.1. Technik der Herstellung der Tissue Microarrays (TMA'S)

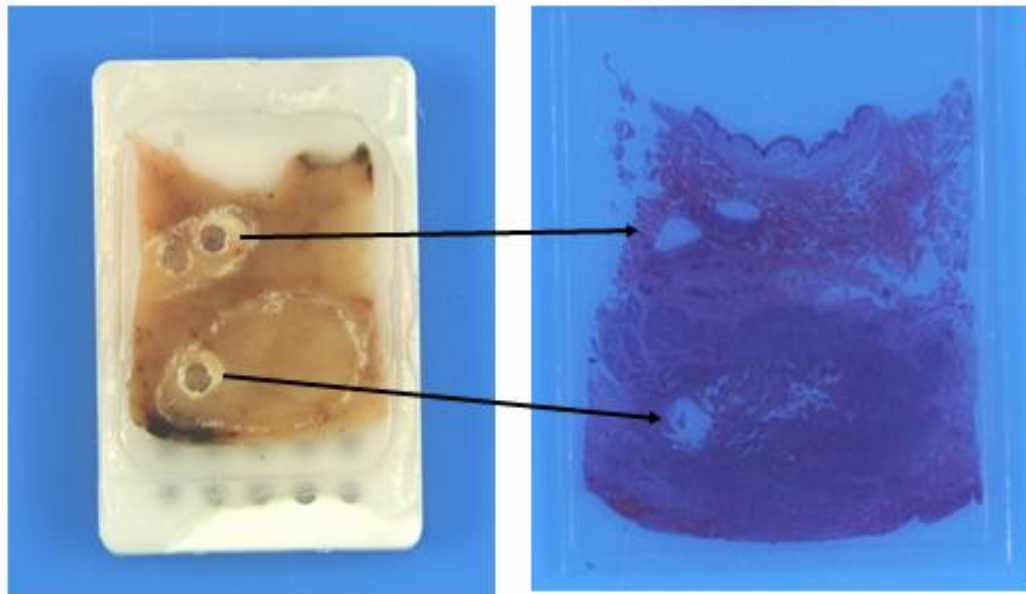
##### Probenauswahl:

Allem voran stand die Selektion der für die Untersuchung relevanten Gewebeproben. Um den am besten geeigneten, tumortragenden Gewebeblock zu identifizieren, mussten zusätzlich die immer in HE-Färbung routinemäßig angefertigten histologischen Schnitte der Operationspräparate nachgemustert und anschließend gegebenenfalls neu klassifiziert werden.

Die Tumorareale wurden auf dem Objektträger mittels eines Permanentschreibers markiert, wobei jene Markierung im Anschluss daran auf den zum Schnitt zugehörigen Paraffinblock übertragen worden ist (siehe Abbildungen 1 und 2).



**Abbildung 1:** Auswahl und Kennzeichnung der Blöcke für die Anfertigung der TMA: Markierung der Tumoranteile auf dem HE-Schnitt und Übertragung auf den dazugehörigen Paraffinblock bei einer Patientin mit LEER-Operation mit Infiltration des peri-vesikalen Gewebes durch ein Plattenepithelkarzinom



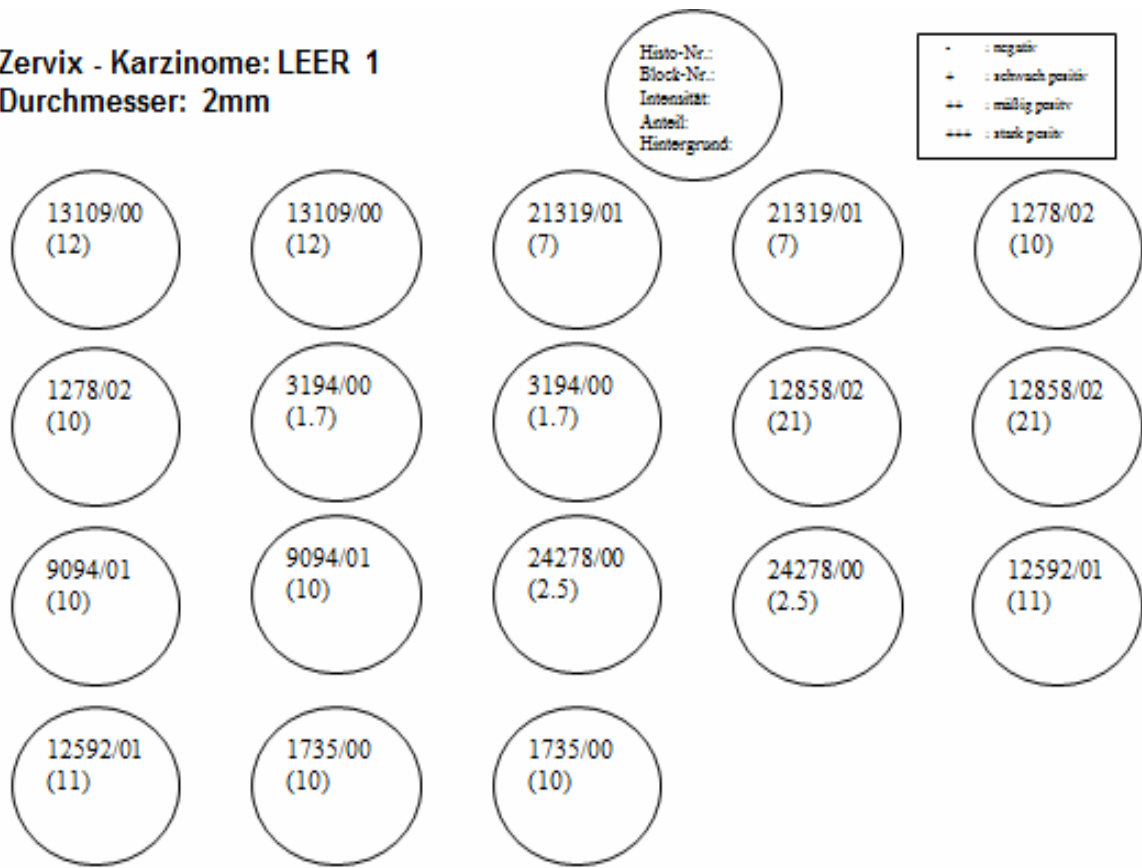
**b**

**Abbildung 2: Kontrollschnitt nach Entnahme der Cores aus dem Tumorgewebe für die TMAs (HE-Färbung)**

Auswerteschema:

Außerdem wurden Schemata erarbeitet, welche die Größe der geplanten LEER- und TMMR-TMA-Blöcke widerspiegeln und Daten wie die Histologie-Nummer, die Block-Nummer, die Färbeintensität, den prozentualen Anteil und nicht zuletzt den Namen des untersuchten Faktors, explizit COX-2, EGFR oder Her2/neu, enthalten. Anhand entsprechender Koordinaten ist es möglich, den entsprechenden Fall, in Form einer Stanze auf dem TMA-Block befindlich, zu identifizieren.

**Zervix - Karzinome: LEER 1**  
**Durchmesser: 2mm**



**Abbildung 3: TMA-Auswerte- und Lokalisationsschema für die Interpretation der immunhistochemischen Färbungen**

Prinzipiell können bis zu 100 Stanzen (teils sogar bis zu 10000; Moch et al. 2001) in einen Block appliziert werden, da jedoch bei so einer hohen Probenanzahl die Auswertung und Dokumentation sehr kompliziert und aufwendig ist, hat man sich bei der Erstellung dieser Arbeit auf maximal 22 Stanzen (entspricht 11 Tumorproben, siehe unten) pro Rezipientblock beschränkt.

Um eine erleichterte Orientierung bei der Auswertung des Objektträgers mit dem histologischen Schnitt bezüglich oben-unten, bzw. vorne-hinten zu ermöglichen, wurde eine absteigende Anzahl von Stanzzyllindern pro Reihe im TMA-Block eingesetzt.

#### TMA-Block-Anfertigung:

Die Herstellung der TMA's bedeutet einen sehr hohen zeitlichen und arbeitsintensiven Aufwand. Zusätzlich ist äußerste Sorgfalt von Nöten.

Für die vorliegende Arbeit wurde der sogenannte Microarrayer verwendet, dieses Gerät ist am weitesten verbreitet und kommerziell erhältlich (Hersteller: Fa. Beecher Instruments; Silver Springs, Maryland, USA). Der Arrayer wird manuell betrieben und es können Gewebezyylinder mit einer Dicke von 0,6 bis 2 mm mit einer Hohnadel ausgestanzt werden.

Hier wurden zuerst Stanzen aus einem angefertigten leeren, als Rezipient-Block fungierenden Paraffinblock gemäß dem vorher erstellten Schema mittels der Hohnadel des Microarrayers entnommen, die Dicke betrug in diesem Fall 2 mm.

Nun wurden aus dem markierten Areal des Ausgangstumorblockes, also dem Donorblock, zwei Gewebezyylinder gestanzt und in den als späteren TMA-Block dienenden Rezipientblock, wieder dem Schema entsprechend, übertragen.

Zur Einschmelzung der Karzinomgewebszyylinder in die Rezipientblöcke wurden jene erhitzt und mit flüssigem Paraffin bedeckt.

Nach entsprechender Abkühlzeit konnten nun von diesen generierten Blöcken multiple, histologische Schnitte mit einem Mikrotom in der üblichen Art und Weise angefertigt werden, welche folglich für die Analyse von pathogenetisch relevanten, prädiktiven und prognostischen Faktoren für die vorliegende Untersuchung zu Verfügung standen (Horn et al. 2005).

### **3.4.2. Immunhistochemie**

#### Färbungsprinzip

Der Nachweis basiert auf der Affinität von Antikörpern zu bestimmten Epitopen im Sinne einer Antigen-Antikörper-Reaktion, wobei eine spezifische und starke Bindung entsteht. Der Antikörper wird über einen biotinylierten Brücken-Antikörper mit einem Detektionssystem gekoppelt, mit welchem seine Existenz im Präparat auch bei nur sehr geringen Mengen an Epitop verstärkt sichtbar

gemacht werden kann. Das Signal des Epitops wird nur an dessen Ort in ausreichender Stärke dargestellt.

Wichtig ist, dass der gegen das aufzufindende Epitop gerichtete Primärantikörper keine Kreuzreaktionen mit ähnlichen Epitopen aufweist und über eine hohe Spezifität sowie Affinität verfügt. Die einzelnen Komponenten des Detektionssystems werden in einem Mehrschrittverfahren zum Präparat hinzugefügt.

#### Indirekte Methode

Bei diesem neueren und in der vorliegenden Arbeit angewendeten Verfahren werden auf das zu untersuchende Gewebe zuerst ein spezifischer Primärantikörper und anschließend ein gegen den Primärantikörper gerichteter Sekundärantikörper aufgetragen. Dieser Sekundärantikörper ist mit einem Enzym gekoppelt und induziert die Farbsynthese mittels einer Enzym-Substrat-Reaktion.

Bei der hier verwendeten Labelled (Strept-) Avidin-Biotin-(LSAB)-Methodik basiert das Prinzip auf der hohen Affinität von Streptavidin, von *Streptomyces avidinii* abstammend, sowie von Avidin aus Hühnereiweiß für Biotin, beide Substanzen weisen jeweils vier Bindungsstellen für Biotin auf.

Hierbei resultiert die Farbentstehung aus der Zugabe eines biotinylierten Sekundärantikörpers zu einem unkonjugierten Primärantikörper sowie der anschließenden Zufuhr des Avidin-Biotin-Enzymkonjugates und danach des Substrat-Chromogen-Komplexes.

#### **3.4.2.1. Immunhistochemische Darstellung von COX-2**

##### Entparaffinierung und Hydratisierung:

Zuerst wurden die Schnitte in Xylol entparaffiniert und in Ethanol-Bädern in absteigender Reihenfolge wieder rehydriert:

2x 10 min. Xylol

2x 3 min. absolutes vergälltes Ethanol

2x 3 min. 96% vergälltes Ethanol

1 min. 85% vergälltes Ethanol

1 min. 70% vergälltes Ethanol

Anschließend wurden die Objektträger kurz in Aqua dest. gespült.

#### Antigendemaskierung:

Um Epitope, welche durch den Fixierungsprozess nicht mehr nachweisbar sind, den immunhistochemischen Nachweismethoden zugänglich zu machen, wurden jene durch die Kombination von einer Pufferlösung und Hitzeeinwirkung wieder freigelegt.

Dazu sind die Schnitte 20 min. lang in 1x Target-Retrieval-Solution mit High pH bei 95°C, in einer sich im Wasserbad befindenden Küvette, erhitzt worden. Danach kühlte die Küvette 20 min. lang in der Lösung ab. Nun erfolgte eine Spülung mit Aqua dest. und anschließend eine Lagerung über 10 min. in Tris-Puffer.

#### Blockierung der endogenen Peroxidaseaktivität:

Anschließend wurden die Präparate über eine Dauer von 30 min. bei Raumtemperatur mit 0,3% Wasserstoffperoxidlösung, welche mit Methanol verdünnt worden ist, inkubiert. Jene Lösung wurde durch Spülen mit Aqua dest. sowie durch die Lagerung in Tris -Puffer über einen Zeitraum von 10 min. wieder entfernt.

Die Schnitte sind währenddessen mit dem DAKO-Pen umrandet worden.

Mit diesem Schritt konnte die Peroxidaseaktivität der Gewebe blockiert werden.

#### Inkubation mit dem Primärantikörper:

Im Kühlschrank bei 4°C erfolgte die Inkubation mit dem Primärantikörper über Nacht. Der Antikörper wurde im Verhältnis 1:100 in das Antikörper-Verdünnungsmedium ChemMate-Antibody-Diluent zugegeben.

Am darauf folgenden Tag sind die Proben zunächst mit Tris-Puffer gespült und anschließend für 2x 5 min. in Tris-Puffer gelagert worden.

#### Inkubation mit dem biotinylierten Sekundärantikörper:

Anschließend fand eine Inkubation der Ansätze über einen Zeitraum von 30 min. mit dem biotinylierten Sekundärantikörper, explizit Multi-link-antibody, statt. Dieser war bereits gebrauchsfertig in der Flasche A des Kits vorhanden. Zwei bis drei Tropfen der Mischung aus dem monoklonalen Maus- und Kaninchen-Antikörper wurden auf jede Probe aufgetragen. Im Anschluss daran wurden eine Spülung mit Tris-Puffer sowie eine darauf folgende zweimalige Lagerung der Schnitte für jeweils 5 min. vorgenommen.

#### Inkubation mit Streptavidin-Peroxidase-Komplex:

Es sind auf jeden Schnitt 2 bis 3 Tropfen der Flasche B aus dem bereits gebrauchsfertigen Kit appliziert worden. Auch hier betrug die Dauer der Inkubation 30 min. Danach wurde die übliche Spülung mit Tris-Puffer und die 2x 5-minütige Lagerung im Tris-Puffer durchgeführt.

Laut Bobrow et al. (1989) und Werner et al. (1996) katalysiert diese Peroxidase das Binden von Tyramin an die Proteine.

#### Färbung mit Diaminobenzidin:

Die Herstellung der Färbelösung erfolgte durch Mischung von 1 ml DAB-Pufferlösung

mit 20 µl DAB-Konzentrat aus dem ChemMate-Kit.

Sehr wichtig war hierbei, dass die lichtempfindliche Lösung erst unmittelbar vor der Verwendung hergestellt wurde, um sie vor einem raschen Zerfall durch Lichteinwirkung zu schützen.

Die bräunliche Färbung der relevanten Bereiche konnte durch enthaltenes Wasserstoffperoxid, welches das farblose DAB mit Hilfe einer Enzym-Substrat-Reaktion in das braune Endprodukt verwandelte, erzielt werden.

Die Präparate sind unter mikroskopischer Sicht für 5-10 min. gefärbt worden. Es schloss sich dann eine 10-minütige Spülung in Aqua dest. an.

#### Hämatoxylin-Gegenfärbung:

Dazu sind die Schnitte für 45 sec. in vorher frisch filtriertem Hämatoxylin nach Harris gegengefärbt und anschließend unter fließendem warmem Leitungswasser für 2 min. gebläut worden.

#### Dehydrierung und permanente Eindeckung:

Zur Dehydrierung wurden folgende Schritte vollzogen:

- 1 min. 70% vergälltes Ethanol
- 1 min. 85% vergälltes Ethanol
- 2x 3 min. 96% vergälltes Ethanol
- 2x 3 min. absolutes vergälltes Ethanol
- 3 min. Xylol
- 10 min. Xylol

Anschließend sind die Schnitte mittels Neutral-Balsam eingedeckt und mit Deckgläschen versehen worden.

### **3.4.2.2. Immunhistochemische Darstellung von Her2/neu und EGFR**

#### Entparaffinierung und Hydratisierung:

In diesem ersten Schritt sind auch hier die in Paraffin eingebetteten Schnitte mit Hilfe von Xylol entparaffiniert und anschließend in Ethanol-Wasser-Bädern in absteigender Konzentration rehydriert worden:

- 3x 5 min. Xylol
- 5 min. absolutes vergälltes Ethanol
- 5 min. 96% vergälltes Ethanol
- 1 min. 75% vergälltes Ethanol
- 5 min. Aqua dest.
- 20 min. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Pufferbad



Danach erfolgte die Lagerung der Schnitte in einer Küvette mit Phosphat-Puffer über einen Zeitraum von 5 min.

#### Vorbehandlung der Schnitte:

EGFR: Es wurde eine 10-minütige Inkubation mit dem Enzym Pronase in einer feuchten Kammer durchgeführt, dabei sind pro Schnitt etwa 70 ml Enzym aufpipettiert worden. Es folgte eine Spülung mit Phosphat –Puffer.

Her2/neu: Hier wurden die Schnitte in einem Schnellkochtopf für 15 min. in einem Citratpuffer, dessen pH-Wert 6,0 betrug, gekocht. Anschließend kühlten sie für weitere 15 min. im Citratpuffer ab und danach erfolgte ein einmaliges Spülen mit Phosphatpuffer.

#### Inkubation mit dem Primärantikörper:

Hier erfolgte die Inkubation der Primärantikörper 30 min. lang bei Raumtemperatur, die Schnitte lagen in der feuchten Kammer. Es sind circa 70 ml Primärantikörper pro Objektträger auf den jeweiligen Schnitt pipettiert worden und die Schnitte wurden während der Inkubation mit einem Deckglas abgedeckt, um zu gewährleisten, dass der Antikörper den Schnitt gleichmäßig und vollständig bedecken kann. Zum Abschluss wurde eine 5-minütige Spülung mit Phosphatpuffer durchgeführt.

EGFR: Der EGFR-Antikörper wurde 1:150 mit dem Verdünnungsmedium der Antibody Diluent der Firma Zytomed verdünnt.

Her2/neu: Der Her2/neu-Antikörper ist ebenso mit dem o.g. Verdünnungsmedium im Verhältnis 1:20 verdünnt worden.

#### Inkubation mit dem biotinylierten Sekundärantikörper:

Die Proben wurden in diesem Fall für 30 min. mit einem biotinylierten Multi-Link Sekundärantikörper inkubiert, welcher mit dem Verdünnungsreagenz der Firma Biogenex 1:20 verdünnt worden ist. Zur Abschlußspülung über einem Zeitraum von 5 min. wurde Phosphatpuffer verwendet.

#### Nachweissystem:

Nun erfolgte die Inkubation der Schnitte bei Raumtemperatur 30 min. lang mit einem Meerrettich-Phosphatase konjugiertem Streptavidin-Komplex, welcher ebenfalls mit dem entsprechenden Verdünnungsreagenz der Firma BioGenex im Verhältnis 1:20 verdünnt worden ist. Auch hier wurde eine 5-minütige Spülung mit Phosphatpuffer durchgeführt.

#### Chromogen:

Die Schnitte wurden 5 min. lang mit DAB (3,3-Diaminobenzidin) inkubiert und anschließend 5 min. mit Aqua dest. gespült.

An das Streptavidin ist Peroxidase gekoppelt, diese katalysiert in Anwesenheit von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> die Oxidation des Farbstoffes zu einem Farbniederschlag. Dieser Farbniederschlag ist bei der Verwendung von DAB braun.

#### Gegenfärbungsverfahren:

Danach wurden die Objektträger für 10 Sekunden in ein Bad mit Meyer's Hämaunlösung getaucht und anschließend sind die Proben 10 min. in Leitungswasser gebläut und aus dem Leitungswasser mit Aquatex eingedeckt worden.

### **3.4.3. Auswertung der immunhistochemisch gefärbten Präparate**

Nach der Färbung der Schnitte nach den oben beschriebenen Methoden erfolgte die mikroskopische Auswertung. Zur Einteilung der Färbungsintensität der Zervixkarzinome wurde eine Skala von 0-3 erhoben, wobei die Werte 0 negativ, 1 schwach positiv, 2 mäßig positiv und 3 stark positiv bedeuten.

Bei Hercept wurden die Werte nicht als Intensität, sondern als Score eruiert, die Werte entsprechen jedoch den oben genannten Zuordnungen. Hierbei sind nur die membranösen Färbeergebnisse eruiert worden in Anlehnung an das für das Mammakarzinom empfohlene System (van Diest et al. 1997).

Für die Evaluation der zytoplasmatischen Färbungsergebnisse von COX-2 wurde das vordefinierte Bewertungssystem, bestehend aus Färbungsintensität

und zusätzlich aus dem prozentualen Anteil der positiv angefärbten Tumorzellen, in die Untersuchung aufgenommen (Half et al. 2002). Zur Kontrolle der Antikörperspezifität wurden Blockierungen mit spezifischen Peptiden durchgeführt, welche in einer Inhibition der COX-2-Färbung resultierten.

Als negativ wurden jene Schnitte gewertet, deren Tumorzellen nach Anfärbung negativ waren, dennoch musste eine interne Positivkontrolle, meist wurde dazu entzündetes Gewebe verwendet, stets durchgeführt werden. In diesen Präparaten erwiesen sich entweder Entzündungs-, Stroma und/ oder Endothelzellen als positiv. Alle anderen negativen Schnitte wurden im Anschluss daran erneut immunhistochemisch angefärbt und erst nach einem zweiten negativen Ergebnis als endgültig negativ gewertet.

Weiterhin erfolgte eine Korrelation zu den erhobenen histo-morphologischen Daten mit Tumorstadium, Grading, Invasionsmuster, peritumorale Desmoplasie sowie peritumorale Entzündung, worauf im Ergebnisteil genau eingegangen wird.

#### **3.4.4. Statistik**

Für die statistische Auswertung ist das Programm SPSS Version 11.5 for Windows benutzt worden.

Als statistische Signifikante wurden die Ergebnisse mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von  $\leq 5\%$  (0,05) betrachtet.

## 4. Ergebnisse

### 4.1. LEER- und TMMR-operierte Zervixkarzinome

#### 4.1.1. Histologische Patientinnencharakteristika

Es wurden insgesamt 45 (= 62%) Patientinnen mittels TMMR- (Primärtumoren) und 28 (= 38%) mit LEER – Operationen (Rezidivtumoren) therapiert. Die Tabelle 1 stellt einige der untersuchten histologischen Charakteristika des gesamten Patientengutes dar. Hinsichtlich der peritumoralen Entzündung ergab sich eine statistische Signifikanz von  $p = 0,003$ .

**Tabelle 1: Charakteristika der Patientinnen mit LEER- bzw. TMMR-operierten Karzinomen**

	gesamt	LEER		TMMR		p-Wert
	n	Anzahl n	n in %	Anzahl n	n in %	
Alter:						
≤ 35 Jahre	10	3	10,7	7	15,6	0,559
> 35 Jahre	63	25	89,3	38	84,4	
Grading:						
G1	17	3	10,7	14	31,1	0,066
G2	36	14	50,0	22	48,9	
G3	20	11	39,3	9	20,0	
Invasionsmuster:						
netzig	17	9	32,1	8	17,8	0,158
plump	56	19	67,9	37	82,2	
peritumorale Desmoplasie:						
keine/ gering	43	18	64,3	25	55,6	0,457
mäßig	17	7	25,0	10	22,2	
stark	13	3	10,7	10	22,2	
peritumorale Entzündung:						
keine	10	6	21,1	4	8,9	0,003
gering	31	17	60,7	14	31,1	
mäßig	9	0	0	9	20,0	
stark	23	5	17,9	18	40,0	

LVSI*:						
keine (L0)	19	5	<b>17,9</b>	14	<b>31,1</b>	0,210
vorhanden (L1)	54	23	<b>82,1</b>	31	<b>68,9</b>	
<b>gesamt (%)</b>	<b>73 (100%)</b>	<b>28</b>	<b>38</b>	<b>45</b>	<b>62</b>	

\* lymphovesicular space involvement

#### 4.1.2. Auswertung der immunhistochemischen Färbung

Wie aus Abbildung 4 ersichtlich ist, war in Bezug auf das gesamte Patientengut zur Hälfte (47,9%) keine EGFR-Expression nachweisbar. Bei HER-2 war in 94,5% aller Patienten keine Färbung im Sinne eines Score 0 nachweisbar (siehe Abbildung 5). Hinsichtlich der COX-2-Überexpression zeigt Abbildung 6, dass bei 31,9% keine Färbung festzustellen war, jeweils ein Viertel aller Patientinnen wies eine mäßige bzw. starke Aktivität auf (Score 2 bzw. 3).

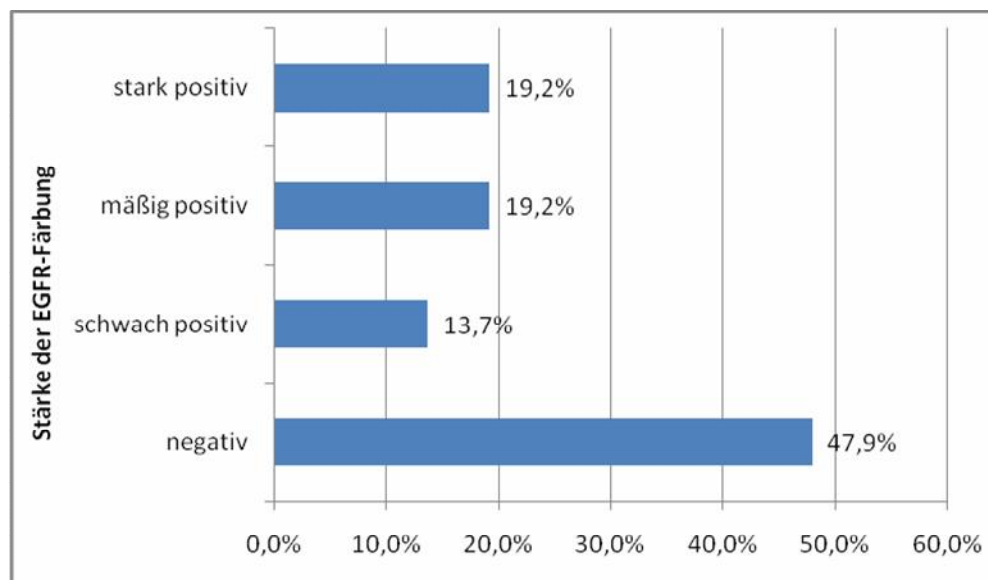
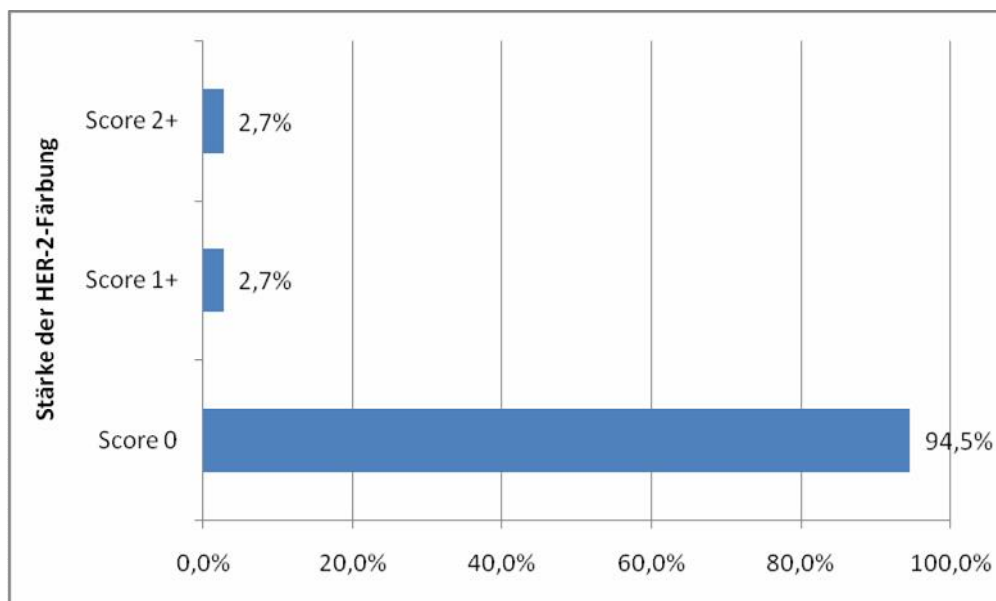
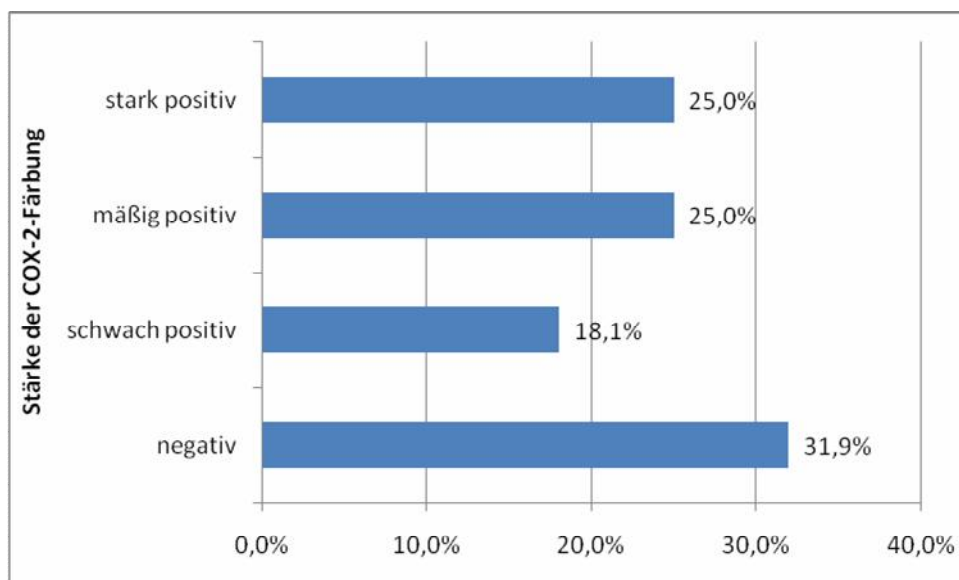


Abbildung 4: Häufigkeit der EGFR-Expression



**Abbildung 5: Häufigkeit der HER-2-Expression**



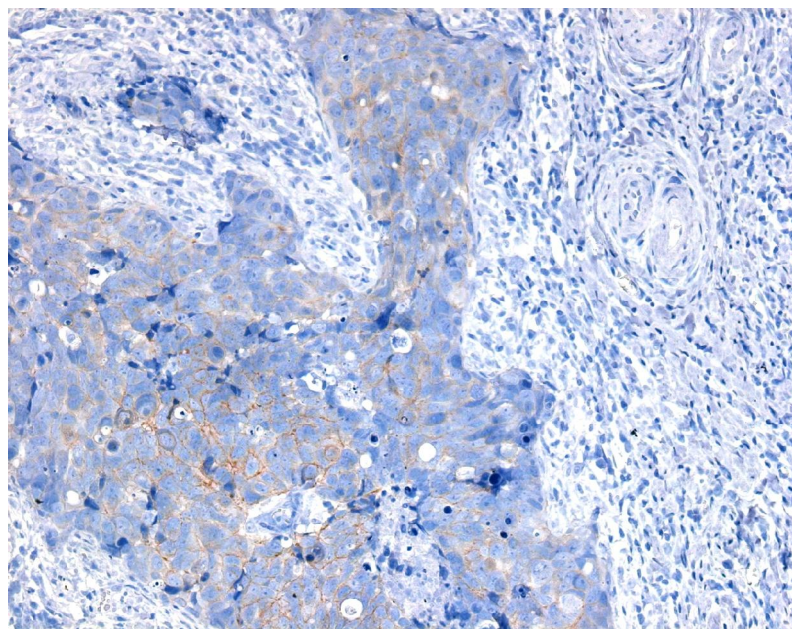
**Abbildung 6: Häufigkeit der COX-2-Expression**

#### **4.1.3. Korrelation von EGFR-, HER-2- und COX-2-Expression mit der Therapiemethode**

Es war sehr auffällig, dass alle untersuchten Proteine nur zu einem geringen Anteil überexprimiert waren. Die Werte schwankten hier je nach Protein zwischen 0% bis maximal 27% Überexpression sowohl bei den TMMR- als auch bei den LEER-operierten Karzinomen. Dennoch ergaben sich keine signifikanten Unterschiede bezüglich den EGFR- ( $p = 0,700$ ), COX-2-Expressionen sowie COX-2-Überexpressionen ( $p = 0,577$ , bzw.  $0,055$ ). Bei der HER-2-Expression konnte im Chi<sup>2</sup>-Test kein Wert ermittelt werden, da 0% der Fälle eine positive Farbreaktion aufwiesen. Die Färbeintensitäten negativ, schwach sowie mäßig positiv (Score 0 – 2) wurden insgesamt jeweils als negativ gewertet. Lediglich die stark positiven Färbungen (Score 3) sind als positiv eingestuft worden. Hinsichtlich der COX-2-Expression gibt es keinen einheitlichen und international akzeptierten Cut-off-Wert, so dass in der vorliegenden Studie ein Wert von  $\geq 75\%$  als Überexpression dieses Entzündungsmediators definiert wurde. Eine genaue Aufschlüsselung der Färbeergebnisse der drei Moleküle findet sich in Tabelle 2.

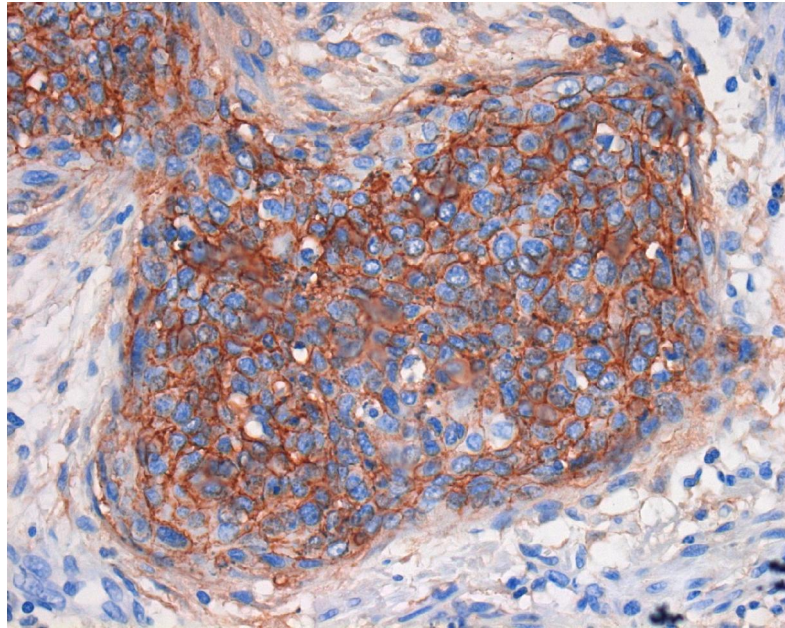
**Tabelle 2: Zusammenhang zwischen der Expression von EGFR, HER-2, COX-2 und den Therapiemethoden LEER und TMMR**

	gesamt	LEER		TMMR		p-Wert
	n (%)	Anzahl n	n in %	Anzahl n	n in %	
EGFR:						
negativ (Score 0-2)	59 (80,8)	22	78,6	37	82,2	0,700
positiv (Score 3)	14 (19,2)	6	21,4	8	17,8	
HER-2:						
negativ (Score 0-2)	73 (100)	28	100,0	45	100	entfällt
positiv (Score 3)	0 (0)	0	0	0	0	
COX-2:						
negativ (Score 0-2)	54 (75,0)	22	78,6	32	72,7	0,577
positiv (Score 3)	18 (25,0)	6	21,4	12	27,3	
COX-2-Überexpression:						
negativ (< 75%)	59 (81,9)	26	92,9	33	75,0	0,055
positiv (≥ 75%)	13 (18,1)	2	7,1	11	25,0	

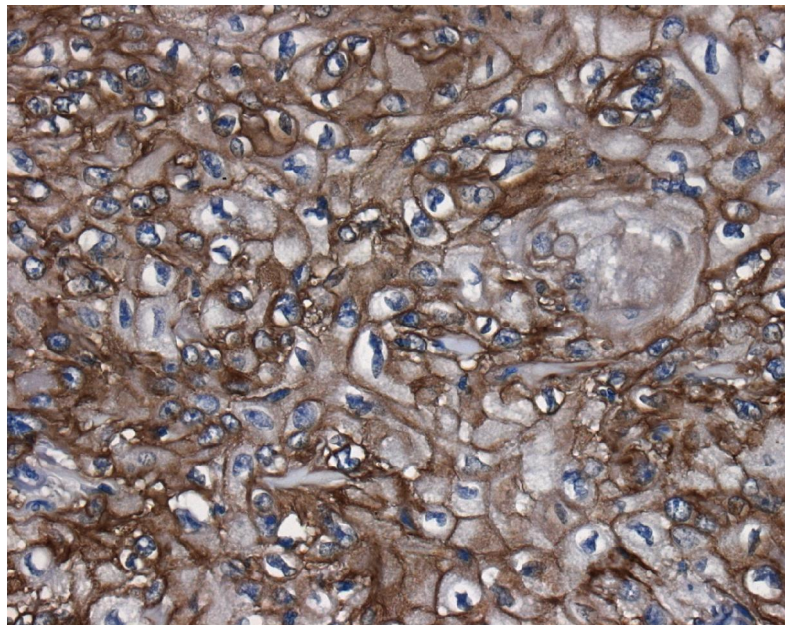


**Abbildung 7: Her-2/neu-Nachweis in einem Plattenepithelkarzinom einer Patientin, die nach der TMMR-Methode operiert wurde: schwache, inkomplette membranständige Färbung (Score 1)**

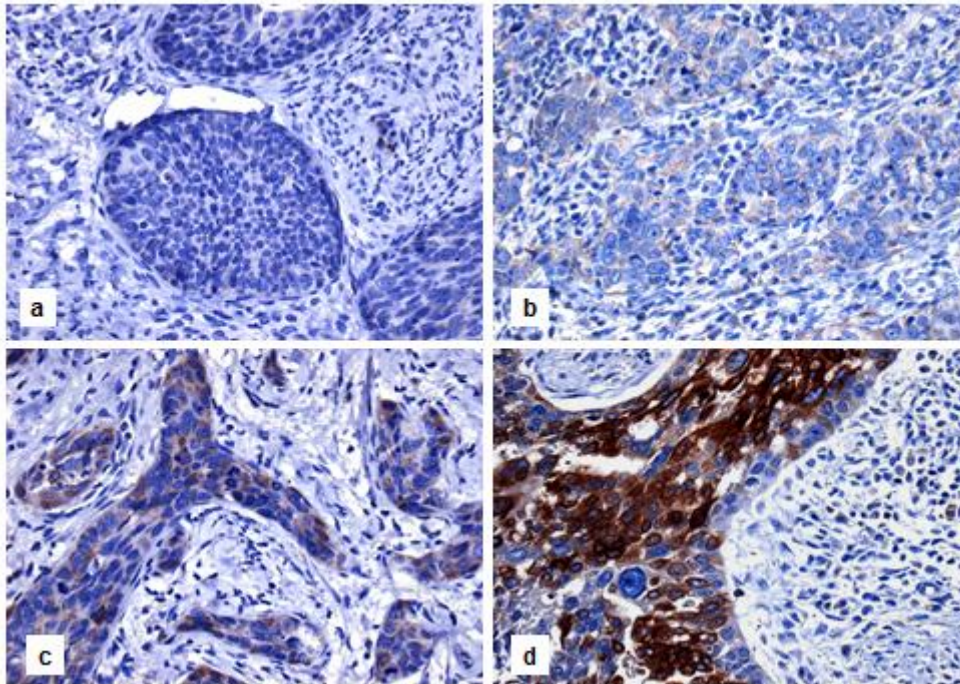




**Abbildung 8:** EGFR-Nachweis in einem Plattenepithelkarzinom einer Patientin, die nach der TMMR-Methode operiert wurde: starke, komplette membranständige Färbung (Score 3), die einer positiven Reaktion entspricht



**Abbildung 9 :** EGFR-Nachweis in einem Plattenepithelkarzinom einer Patientin mit einem Beckenrezidiv eines Zervixkarzinoms, die nach der LEER-Methode operiert wurde: starke, komplette membranständige Färbung (Score 3), die einer positiven Reaktion entspricht



**Abbildung 10: COX-2-Nachweis in Plattenepithelkarzinomen der Cervix uteri**

- A) negative Färbereaktion mit fehlender Anfärbung der Zellen
- B) schwache Färbereaktion mit membran-ständiger und zytoplasmatischer Färbung in ca. 95% der Tumorzellen
- C) mäßiggradige Färbereaktion der Zellen in ca. 66% der Tumorzellen
- D) mäßiggradige Färbereaktion der Zellen in ca. 80% der Tumorzellen

#### **4.1.4. Therapiemethoden in Abhängigkeit von der Tumorausdehnung**

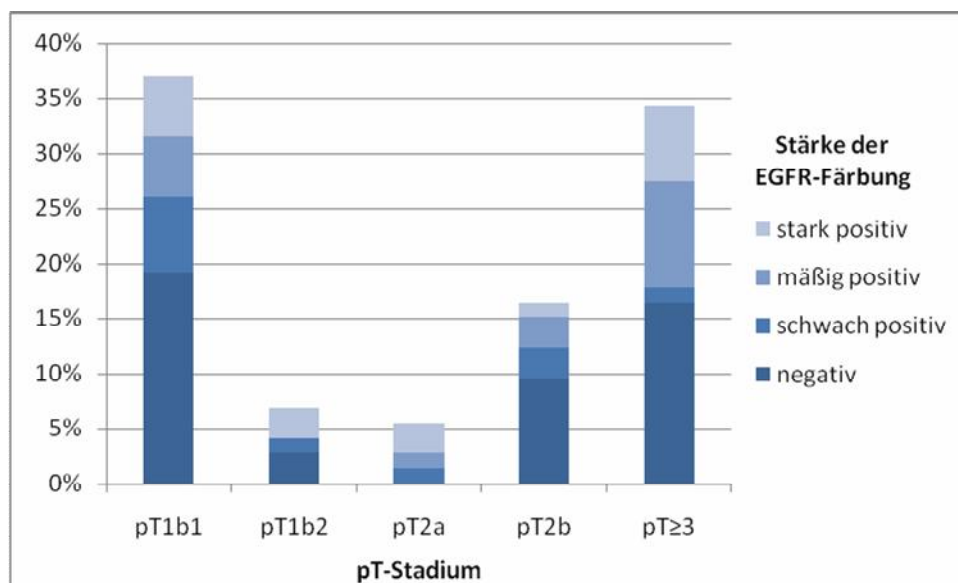
Von dem gesamten Patientinnengut sind, wie bereits erwähnt, 38% mittels der LEER- und 62% mittels der TMMR-Technik operiert worden. Die LEER wurde bei Patienten mit Rezidiven vorgenommen, was das Vorliegen hoher pT-Stadien in diesen Fällen erklärt. Nur 14% der Patientinnen waren dem Stadium pT2b und ganze 86% dem Stadium  $\geq$ pT3 zugeteilt. Vornehmlich niedrige pT-Stadien finden sich bei der TMMR, da diese Technik bei Primärtumoren angewendet wird. So sind mit einer Mehrheit von 60% die Karzinome im Stadium pT1b1 reseziert worden. Die Tabelle 3 zeigt die genannten, hochsignifikanten Zusammenhänge deutlich ( $p < 0,00001$ ).

**Tabelle 3: Abhängigkeit der Primärtumoren, bzw. Rezidive vom pT-Stadium**

<b>pT-Stadium</b>	<b>LEER</b> (n in %)	<b>TMMR</b> (n in %)	<b>gesamt</b> (n in %)	<b>p-Wert</b>
<b>pT1b1</b>	0	60	37	<b>0,00001</b>
<b>pT1b2</b>	0	11	7	
<b>pT2a</b>	0	9	5	
<b>pT2b</b>	14	18	16	
<b>≥pT3</b>	86	2	34	
<b>gesamt (%)</b>	100 (38%)	100 (62%)	100	

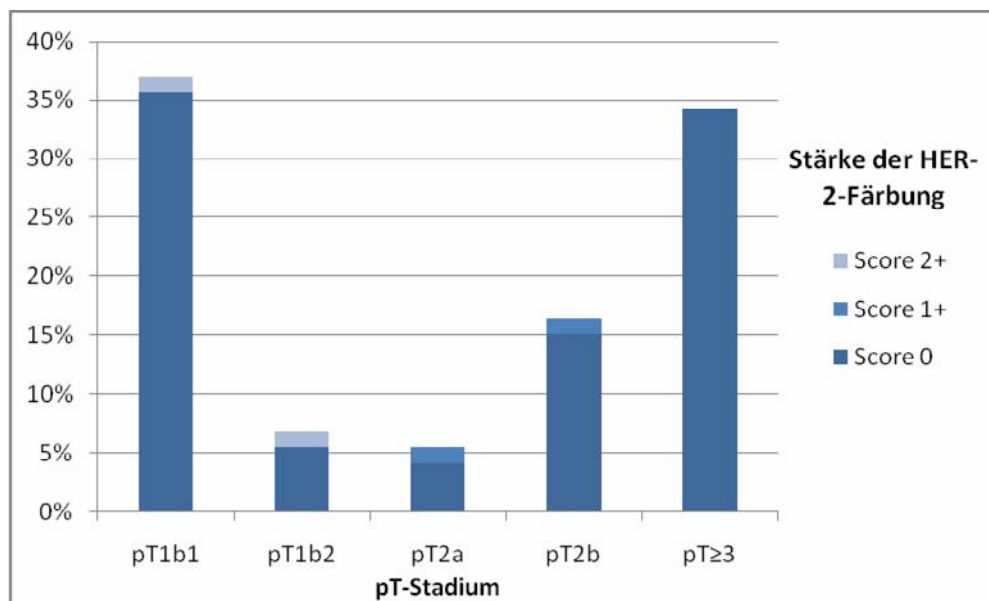
#### **4.1.5. Beziehung zwischen EGFR-, HER-2 und COX-2-Expression und pT-Stadium**

Während bei EGFR und COX-2 in den Stadien pT1b1 und ≥pT3 insgesamt am häufigsten positive Färbeergebnisse auftraten, so zeigten sich bei HER-2 in genau diesen Stadien die meisten negativen Färberesultate. Wichtig ist an dieser Stelle noch einmal zu erwähnen, dass 94,5% aller Karzinome HER-2-negativ waren (siehe Abbildungen 11 - 13).

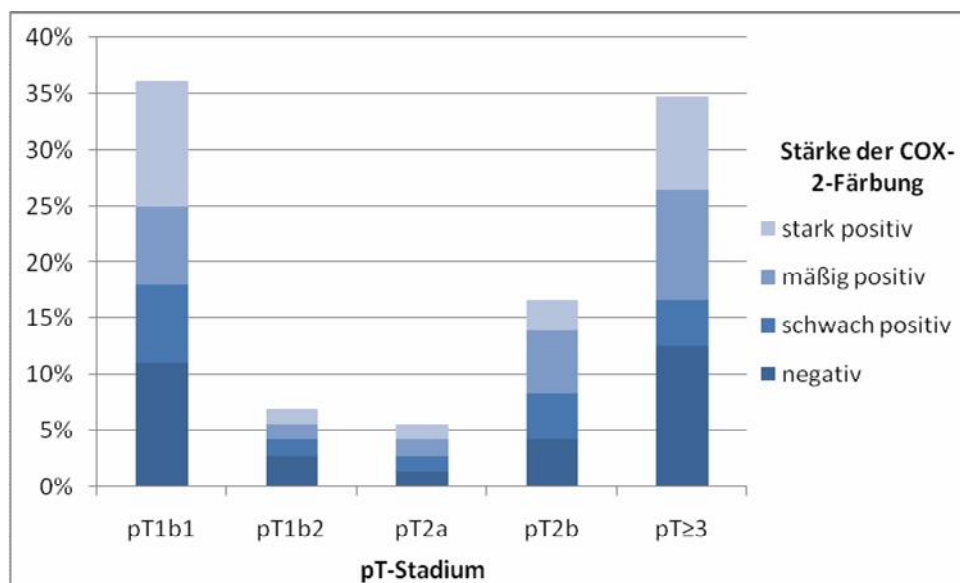


**Abbildung 11: Häufigkeit der EGFR-Expression in Abhängigkeit von der Tumorausdehnung, p = 0,480**





**Abbildung 12: Häufigkeit der HER-2-Expression in Abhängigkeit von der Tumorausdehnung,  $p = 0,028$**



**Abbildung 13: Häufigkeit der COX-2-Expression in Abhängigkeit von der Tumorausdehnung,  $p = 0,995$**

Die Werte der COX-2-positiven Zervixkarzinome wurden zusätzlich in Zehnerschritten von 1 bis 100 Prozent eingeteilt. Die Tabelle 4 zeigt eine Aufschlüsselung entsprechend der Mittelwerte. Das follow – up beträgt 96 Monate.

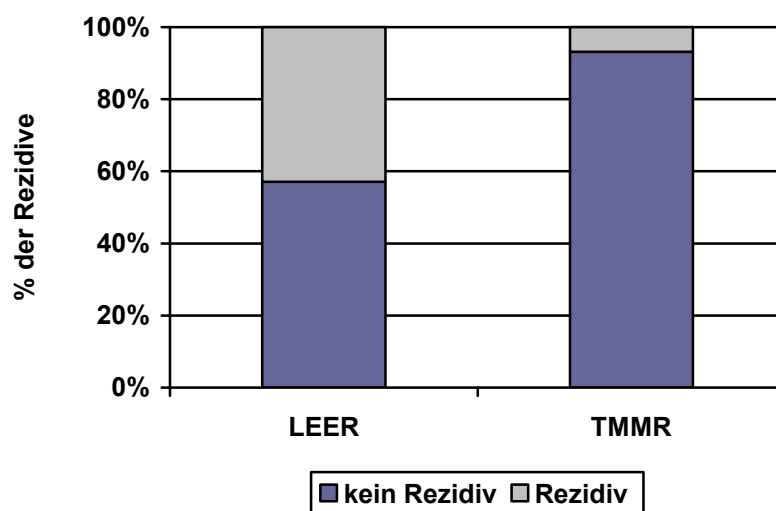
**Tabelle 4: Mittelwerte der Prozentsätze COX-2-positiver Tumoren in Abhängigkeit von den Tumorstadien,  $p = 0,704$**

pT-Stadium	Ergebnis (n in %)
pT1b1	31,9
pT1b2	26,4
pT2a	22,5
pT2b	34,3
≥pT3	18,8

## 4.2. Deskription der Rezidivhäufigkeit

### 4.2.1. Rezidivaufreten bei den LEER- und TMMR-operierten Tumoren

Insgesamt 21% aller Patientinnen erlitten im Beobachtungszeitraum ein Rezidiv. Die folgende Abbildung 14 stellt den Anteil der Rezidive jeweils bei den LEER- und TMMR-Operierten dar. Während bei den LEER-operierten Patientinnen in 42,9% ein Rezidiv auftrat, zeigte sich bei den TMMR-therapierten Frauen nur in einer sehr niedrigen Frequenz (6,8% der Fälle) ein Rezidiv.



**Abbildung 14: Rezidivhäufigkeit bei den LEER- und TMMR-operierten Tumoren**

#### 4.2.2. Zusammenhang zwischen OP-Datum und Auftreten eines Rezidivs

Von den 42,9% der LEER-Therapierten ist 75% der Fälle in den ersten 18 Monaten postoperativ die Diagnose eines Rezidivs gestellt worden. Die übrigen 25% entwickelten ein Rezidiv nach bis zu 37 Monaten postoperativ. Anders sah es bei den geringen 6,8% der TMMR-operierten Patientinnen, welche ein Rezidiv ausbildeten. Bei den insgesamt nur 3 Patientinnen ist bereits innerhalb der ersten 12 Monate postoperativ ein Rezidiv entdeckt worden. Diese Beobachtungen veranschaulicht die Tabelle 5.

**Tabelle 5: Auftreten eines Rezidivs in Monaten post operationem bei den LEER- und TMMR-Operationsvarianten**

Monate nach OP	LEER		TMMR	
	n (in%)	kumulierte %	n (in%)	kumulierte %
1-6	3 (25,0%)	25,0%	1 (33,3%)	33,3%
7-12	4 (33,3%)	58,3 %	2 (66,7%)	100%
13-18	2 (16,7%)	75,0%		
19-24	1 (8,3%)	83,3%		
25-30	1 (8,3%)	91,6%		
31-36				
37	1 (8,3%)	100%		

#### 4.2.3. Relation von Rezidiven und Invasionsmuster, Desmoplasie, peritumoraler Entzündung, Lymphbahneinbrüchen und dem immunhistologischen Nachweis der EGFR-, HER-2- und COX-2-Färbung

Es ist erwähnenswert, dass in der Mehrheit plumpe Tumorinvasionsmuster sowie Einbrüche des Karzinoms in die Lymphbahnen zu verzeichnen waren, sowohl bei den TMMR- als auch bei den LEER-therapierten Patientinnen. Bezüglich der EGFR-, HER-2- und COX-2-Färbeintensitäten war auffällig, dass alle Patientinnen in der Mehrheit negative Färbeergebnisse und somit keine Überexpression aufwiesen, bei den TMMR-Rezidiven und allen HER-2-Fällen

sogar zu 100%. Aber auch in Betracht auf die rezidivfreien Fälle ist ersichtlich, dass der größte Anteil der histologischen Präparate nicht gefärbt war. Die hier erläuterten Zusammenhänge und Werte sind in den Tabellen 6a und 6b dargestellt.

**Tabelle 6a: Zusammenhang zwischen Invasionsmuster, Desmoplasie, peritumoraler Entzündung, Tumoreinbrüchen in die Lymphbahnen, EGFR-, HER-2- und COX-2-Färbung sowie Rezidivaufreten bei den LEER-Patientinnen**

	LEER (n= 28)			
	Rezidiv	kein Rezidiv	gesamt	p-Wert
	n=12 n (%)	n=16 n (%)	n=28 n (%)	
Invasionsmuster:				
netzig	4 (33,3)	5 (31,3)	9 (32,1)	0,907
plump	8 (66,7)	11 (68,7)	19 (67,9)	
Desmoplasie:				
keine/ gering	9 (75,0)	9 (56,3)	18 (64,3)	0,269
mäßig	3 (25,0)	4 (25,0)	7 (25,0)	
stark	0	3 (18,8)	3 (10,7)	
peritumorale Entzündung:				
keine	4 (33,3)	2 (12,5)	6 (21,4)	0,406
gering	6 (50,0)	11 (68,7)	17 (60,7)	
mäßig	0	0	0	
stark	2 (16,7)	3 (18,8)	5 (17,9)	
LVSI*:				
keine (L0)	2 (16,7)	3 (18,8)	5 (17,9)	0,887
vorhanden (L1)	10 (83,3)	13 (81,3)	23 (82,1)	
EGFR:				
negativ (Score 0-2)	8 (66,7)	14 (87,5)	22 (78,6)	0,184
positiv (Score 3)	4 (33,3)	2 (12,5)	6 (21,4)	
HER-2:				
negativ (Score 0-2)	12 (100)	16 (100)	28 (100)	entfällt
positiv (Score 3)	0	0	0	
COX-2:				
negativ (Score 0-2)	10 (83,3)	12 (75,0)	22 (78,6)	0,595
positiv (Score 3)	2 (16,7)	4 (25,0)	6 (21,4)	

**Tabelle 6b: Zusammenhang zwischen Invasionsmuster, Desmoplasie, peritumoraler Entzündung, Tumoreinbrüchen in die Lymphbahnen, EGFR-, HER-2- und COX-2-Färbung sowie Rezidivaufreten bei den TMMR-Patientinnen**

	TMMR (n= 45)			
	Rezidiv	kein Rezidiv	gesamt	p-Wert
	n=3 n (%)	n=41 n (%)	n=44 n (%)	
Invasionsmuster:				
netzig	0	8 (19,5)	8 (18,2)	0,398
plump	3 (100)	33 (80,5)	36 (81,8)	
Desmoplasie:				
keine/ gering		24 (58,5)	24 (54,6)	0,098
mäßig	1 (33,3)	9 (22,0)	10 (27,7)	
stark	2 (66,6)	8 (19,5)	10 (27,7)	
peritumorale Entzündung:				
keine	0	4 (9,8)	4 (9,1)	0,075
gering	3 (100,0)	11 (26,8)	14 (31,8)	
mäßig	0	9 (22,0)	9 (20,5)	
stark	0	17 (41,5)	17 (38,6)	
LVSI*:				
keine (L0)	0	13 (31,7)	13 (29,5)	0,245
vorhanden (L1)	3 (100,0)	28 (68,3)	31 (70,5)	
EGFR:				
negativ (Score 0-2)	3 (100,0)	33 (80,5)	36 (81,8)	0,398
positiv (Score 3)	0	8 (19,5)	8 (18,2)	
HER-2:				
negativ (Score 0-2)	3 (100,0)	41 (100)	44 (100)	entfällt
positiv (Score 3)	0	0	0	
COX-2:				
negativ (Score 0-2)	3 (100,0)	28 (70,0)	31 (72,1)	0,264
positiv (Score 3)	0	12 (30,0)	12 (27,9)	



### 4.3. Überlebensanalyse

Wie aus den Tabellen 7a und 7b ersichtlich, war bei allen drei Biomarkern und ganz besonders bei den TMMR-Tumoren in der Mehrheit zum Zeitpunkt der letzten Nachricht eine Remission der Tumoren (NED) zu beobachten. Diese Zusammenhänge waren jedoch nur in Bezug auf das EGFR-Molekül bei den LEER-Karzinomen signifikant ( $p = 0,034$ ). Es ist deutlich, dass die TMMR-therapierten Tumoren eine wesentlich bessere Prognose haben, denn Fernmetastasen und Todesfälle sind zum Zeitpunkt der letzten Nachricht der Patientinnen ausschließlich bei den LEER-operierten Karzinomen aufgetreten. Der auf diese Variablen angewendete Chi<sup>2</sup>-Test bestätigte diesen Zusammenhang mit einem hochsignifikanten p-Wert von  $<0,00001$ .

**Tabelle 7a: Abhängigkeit des Status der letzten Nachricht von der EGFR-, HER-2- sowie COX-2-Färbeintensität bei den LEER-Patientinnen**

LEER	Status letzter Nachricht					
	NED*	Rezidiv	Fern- metas- tasen	ver- storben	gesamt	p-Wert
	n=13	n=3	n=2	n=10	n=28	
EGFR:						
negativ (Score 0-2)	11 (84,6)	2 (66,6)	0	9 (90,0)	22 (78,6)	0,034
positiv (Score 3)	2 (15,4)	1 (33,3)	2 (100)	1 (10,0)	6 (21,4)	
HER-2:						
negativ (Score 0-2)	13 (100)	3 (100)	2 (100)	10 (100)	28 (100)	entfällt
positiv (Score 3)	0	0	0	0	0	
COX-2:						
negativ (Score 0-2)	9 (69,2)	2 (66,6)	2 (100)	9 (90,0)	22 (78,6)	0,523
positiv (Score 3)	4 (30,8)	1 (33,3)	0	1 (10,0)	6 (21,4)	

**Tabelle 7b: Abhängigkeit des Status der letzten Nachricht von der EGFR-, HER-2- sowie COX-2-Färbeintensität bei den TMMR-Patientinnen**

TMMR	Status letzter Nachricht					
	NED*	Rezidiv	Fern- metas- tasen	ver- storben	gesamt	p-Wert
	n=42	n=2	n=0	n=0	n=44	
EGFR:						
negativ (Score 0-2)	34 (81,0)	2 (100)	0	0	36 (81,8)	0,495
positiv (Score 3)	8 (19,0)	0	0	0	8 (18,2)	
HER-2:						
negativ (Score 0-2)	42 (100)	2 (100)	0	0	44 (100)	entfällt
positiv (Score 3)	0	0	0	0	0	
COX-2:						
negativ (Score 0-2)	29 (70,7)	2 (100)	0	0	31 (72,1)	0,368
positiv (Score 3)	12 (29,3)	0	0	0	12 (27,9)	

\*NED = no evidence of disease

#### **4.4. Peritumorale Entzündungsreaktion**

Bezüglich der in der folgenden Tabelle 8 und Abbildungen 9 und 10 aufgelisteten histologischen Charakteristika ergaben sich keine statistischen Signifikanzen. Nur zu 25% waren die Färbungen auf COX-2 positiv, eine COX-2-Überexpression hat nur in 18,1% der Fälle stattgefunden. (Da es hier keinen einheitlichen, international akzeptierten Cut-off-Wert gibt, wurde in der vorliegenden Arbeit ein Wert von  $\geq 75\%$  als Überexpression des COX-2-Moleküls definiert.) Ein möglicher Zusammenhang der Überexpression von COX-2 mit dem Grad der peritumoralen Entzündung konnte anhand dieser Untersuchung nicht bestätigt werden (siehe Tabelle 8 und Abbildungen 15 und 16).

Tabelle 8: Korrelation der peritumoralen Entzündung mit der COX-2-Färbeintensität

COX-2	peritumorale Entzündung				gesamt	p-Wert
	keine	gering	mäßig	stark		
	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	
<b>negativ (Score 0-2)</b>	6 (60,0)	26 (83,9)	6 (66,7)	16 (72,7)	54 (75,0)	0,408
<b>positiv (Score 3)</b>	4 (40,0)	5 (16,1)	3 (33,3)	6 (27,3)	18 (25,0)	
<b>COX-2-Überexpression:</b>						
<b>&lt; 75%</b>	7 (70,0)	27 (87,1)	7 (77,8)	18 (81,8)	59 (81,9)	0,653
<b>≥ 75%</b>	3 (30,0)	4 (12,9)	2 (22,2)	4 (18,2)	13 (18,1)	
<b>gesamt (%)</b>	10 (100%)	31 (100%)	9 (100%)	22 (100%)	72 (100%)	

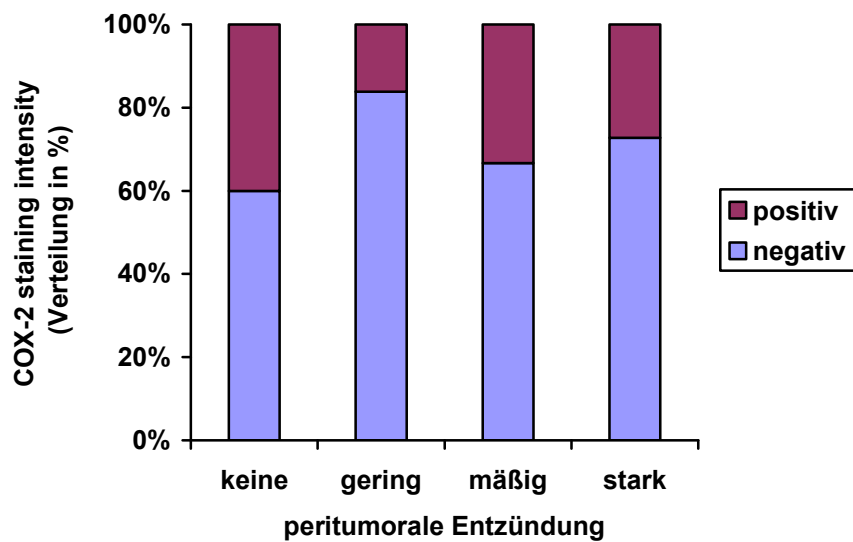


Abbildung 15: peritumorale Entzündung in Abhängigkeit von der Intensität der COX-2-Expression (prozentuale Verteilung), p=0,408

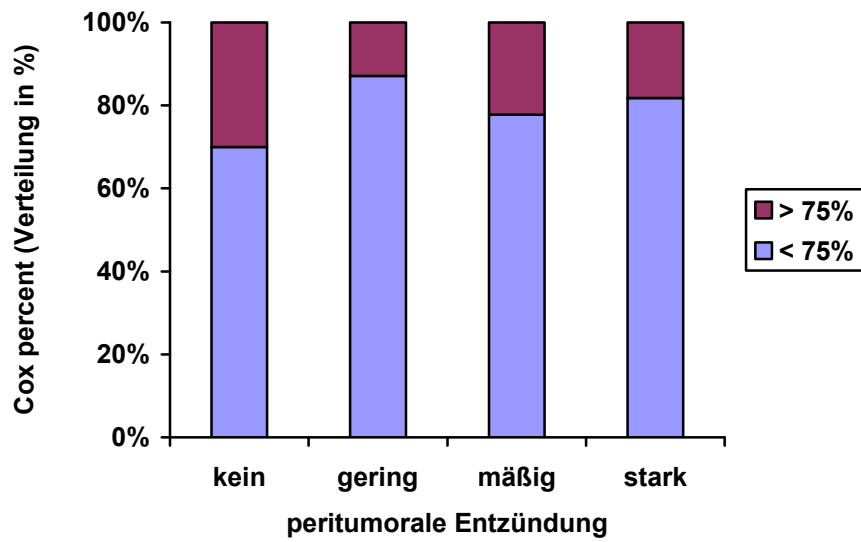


Abbildung 16: Zusammenhang zwischen peritumoraler Entzündung und COX-2-Überexpression (prozentuale Verteilung),  $p=0,700$

## **5. Diskussion**

Um die Therapie des Zervixkarzinomes weiter zu optimieren und vor allem zu individualisieren, wird weltweit versucht, prognostische Marker zu ermitteln.

Ziel dieser retrospektiven Studie war es, zum einen die Frequenz der Expression von EGFR, HER-2 und COX-2 im Zervixkarzinom in fortgeschrittenen Stadien ohne Vorbehandlung mittels Chemo- oder Radiotherapie zu evaluieren. Zum anderen ging es um die Bestimmung von Unterschieden beim Vergleich von TMMR-operierten Primärtumoren und LEERtherapierten Rezidiven.

Da primär das Hauptaugenmerk dieser Studie auf der Detektion der o.g. Rezeptoren, bzw. Enzyme lag, um herauszufinden, ob diese als Risikofaktoren etabliert werden können, wird weniger intensiv auf die untersuchten histologischen Parameter wie Grading, peritumorale Entzündung, Lymphbahneinbrüche und Desmoplasie eingegangen.

### **5.1. Vor- und Nachteile der TMA's**

#### **5.1.1. Vorteile der TMA's**

Es kann eine große Probenanzahl innerhalb kürzester Zeit bezüglich Relevanz neuer Marker, vor allem hinsichtlich dessen Expressionsprofile, evaluiert werden. Zusätzlich ist eine effiziente Korrelation klinisch-pathologischer Daten bereits evaluierter Marker mit neuen Parametern, inklusive der Überprüfung prädiktiver Marker an prätherapeutisch entnommenem Gewebe, möglich. Weiterhin kann eine Überprüfung und Validierung von Untersuchungsergebnissen von cDNA-Microarrays in einem kurzen Zeitraum stattfinden. Es herrschen identische Versuchsbedingungen für alle im TMA-Block enthaltenen Probenmaterialien während einer Untersuchung, woraus eine Verminderung der Fehlerbreite resultiert. Nachweislich ist außerdem eine deutliche Reduktion des Kosten- sowie Zeitaufwandes für die immunhistochemischen, aber auch FISH-Untersuchungen durch einen

geringeren Chemikalienverbrauch und bezogen auf die zu untersuchende Fallzahl sind weniger Arbeitsschritte notwendig. Die Menge an Gewebe zur Testung eines neuen Parameters kann immens reduziert werden, explizit kann Probenmaterial aus bereits reseziertem Gewebe entnommen werden. Durch die nur minimalen Gewebeverluste bei TMA-Stanzen bleibt der Donorblock in der Regel erhalten. Somit besteht die Möglichkeit einer erneuten Nutzung, bzw. einer histopathologischen Reevaluierung, wie zum Beispiel bei juristischen Fragestellungen (Horn et al. 2005).

### **5.1.2. Nachteile der TMA's**

Aufgrund einer teilweise hohen Hintergrundfärbung kann gegebenenfalls die Auswertung immunhistochemischer Reaktionen erschwert sein. Gulman & O'Grady (2003) stellten jedoch fest, dass bei Markern mit einer zellmembranständigen Expression, wie zum Beispiel EGFR und HER-2, meist keine Limitationen nachweisbar sind. Tissue Microarrays sind nur limitiert geeignet für Untersuchungen, mit welchen ein bestimmter Marker bezüglich seiner Verteilung innerhalb eines Tumors, wie zum Beispiel Invasionsfront versus Zentrum des Tumors, evaluiert werden soll. Eventuell kann eine Dislokation oder ein Herausbrechen der Stanzen (sogenanntes „Abschwimmen“) oder auch der Schnitte auftreten durch verschiedene Gewebedichten innerhalb der einzelnen Stanzen oder aber durch eine differente Festigkeit des Paraffins in den jeweiligen Donorblöcken, bzw. im Tissue Microarray-Block. Laut Hoos & Cordon-Cardo (2001) liegt die Häufigkeit dafür zwischen 3% und 15%. Dieses Risiko kann vermindert werden durch Erhitzen nach Fertigstellung des Rezipient-Blockes auf 37°C über einen Zeitraum von ca. 30 Minuten, denn dadurch Verschmelzen die Paraffinanteile der verschiedenen Donorblöcke im Rezipientblock (Horn et al. 2005, Hoos & Cordon-Cardo 2001).

## **5.2. Altersverteilung**

Es gibt in der Literatur viele kontroverse Diskussionen über einen Zusammenhang zwischen Lebensalter und Prognose, die Altersgrenze wird meist beim 35. Lebensjahr gezogen (Roschlau 2003, Horn et al. 2001, Horn 2000, Chen et al. 1999). In der vorliegenden Untersuchung betrug das Durchschnittsalter aller Patientinnen zum Zeitpunkt der Operation 47,4 Jahre, dabei waren die jüngste im Alter von 27 und die älteste im Alter von 77 Jahren. Der Medianwert betrug für die Primärtumoren 51 Jahre und für die Rezidive 43 Jahre. Der Häufigkeitsgipfel lag bei einer Unterteilung in Lebensdekaden in der Gruppe der 30- bis 39-Jährigen. Es zeigte sich subsumierend, dass sowohl bei den Primär- als auch bei den Rezidivtumoren ab dem 35. Lebensjahr sichtlich mehr Patientinnen an einem Zervixkarzinom erkrankten. Es waren nur 15,6% der Primärkarzinom-Fälle und 10,7% der Rezidivpatientinnen unter 35 Jahre alt. Daraus könnte sich ableiten lassen, dass das Risiko für diesen malignen Prozess ab Mitte der dritten Lebensdekade erhöht zu sein scheint. Diese Wertung lässt sich jedoch nicht auf die Gesamtbevölkerung projizieren, denn die Verteilung der Patientinnenanzahl auf die verschiedenen Altersgruppen war sehr ungleichmäßig und somit lässt die teilweise relativ geringe Prozentzahl pro Lebensdekade nur eine Aussage zur Tendenz zu. Daraus erklärt sich auch, dass in dieser Studie diesbezüglich keine statistisch signifikanten Zusammenhänge ( $p=0,559$ ) gefunden werden konnten. Autoren wie Kim et al. (2004), Rosty et al. (2004), Niibe et al. (2003), Kim et al. (2002), Nishioka et al. (1999) und Ndubisi et al. (1997) berichteten ebenso von fehlenden signifikanten Anhängigkeiten hinsichtlich des Alters.

## **5.3. Deskription der Tumorfärbung**

Die Proteine der ErbB-Familie, zu der EGFR und HER-2 (auch HER-2-neu oder c-erbB-2 genannt) gehören, stellen Protoonkogene dar, durch die maligne

Zellen einen selektiven Wachstumsvorteil erzielen können. Durch eine ligandenspezifische Bindung wird die Tyrosinkinase dieser Rezeptoren phosphoryliert und die Signalkaskade initiiert, woraus Zellproliferation, Differentiation, Migration, Adhäsion, Apoptoseschutz sowie Transformation resultieren (Arteaga 2011, Lee et al. 2005, Lee et al. 2004, Dent et al. 2003, Nevin et al. 1999, Woodburn 1999, Nakano et al. 1997). Es sind zwei Therapieansätze, welche auf den bekannten Funktionen von EGFR und HER-2 basieren, entwickelt worden (Arteaga 2011, Lee et al. 2004, Dent et al. 2003, Woodburn 1999). Der erste Therapieansatz involviert die Entwicklung der humanen monoklonalen Antikörper gegen die extrazelluläre Domäne des Rezeptors, welche diesen herunterreguliert und weitere Ligandenbindungen blockiert. Als zweite Möglichkeit können Adenosin-Triphosphat- (ATP) – Mimetika generiert werden, welche sich mit dem ATP zusammenschließen und an die Kinase-Bindungsstelle des Rezeptors binden. Somit verhindern sie die Möglichkeit, dass EGFR intrazelluläre Signale transduziert (Arteaga 2011, Lee et al. 2004, Woodburn 1999).

Die COX-2 ist ein von Zytokinen induzierbares Enzym, welches in einer Vielzahl von Neoplasien hochreguliert ist und Prostaglandine, die die Apoptose supprimieren und die Angiogenese sowie Tumordinvasion fördern, metabolisiert (Eichele et al. 2008, Kang et al. 2006, Kim et al. 2004, Gaffney et al. 2003, Masferrer et al. 2000).

Eine Detektion der vermehrten Expression dieser Proteine in Tumoren könnten Informationen über ein krankheitsfreies Überleben bzw. generell zur Überlebenszeit liefern (Chavez-Blanco et al. 2004, Kim et al. 2002, Kersemaekers et al. 1999, Beckmann et al. 1993).

In der vorliegenden Untersuchung wurden bei allen drei Onkoproteinen jeweils nur zu einem geringen Anteil positive Färbeergebnisse beobachtet. Nur 19% der EGFR-, 0% der HER-2- und 25% der COX-2-Fälle waren positiv, sodass die Aussagekraft dieser drei untersuchten Biomarker bezüglich der Überlebenszeit nach dieser Studie limitiert ist.



#### **5.4. Vergleich der EGFR-, HER-2 und COX-2-Expression mit den TMMR- und LEER-operierten Zervixkarzinomen**

Ein Vergleich mit der Literatur war aufgrund fehlender Studien zu dem Thema dieser Promotion nicht möglich.

##### **5.4.1. EGFR-Expression bei den primären und rezidierten Zervixkarzinomen**

Hier war bei 19,2% des Gesamtpatientengutes eine Expression dieses Wachstumsfaktors nachweisbar. Von den TMMR-Tumoren zeigten 17,8% und von den LEER-Tumoren 21,4% jeweils positive Farbreaktionen auf das EGFR-Molekül. Somit zeichnet sich anhand dieser Untersuchung die Tendenz ab, dass sowohl bei den TMMR- als auch LEER-operierten Karzinomen nur selten eine EGFR-Überexpression stattfindet. Ebenso bestehen keine nennenswerten Unterschiede zwischen diesen beiden Therapievarianten ( $p=0,700$ ).

Es gibt einige Studien zur EGFR-Expression beim Zervixkarzinom mit kontroversen Ergebnissen zu denen der vorliegenden Untersuchung. So beobachteten Chang et al. (1999), Maruo et al. (1992) sowie Berchuck et al. (1990) die Frequenz und Distribution des EGF-Rezeptors in Relation zu neoplastischen Veränderungen der Zervix uteri und stellten eine Überexpression vor allem in Plattenepithelkarzinomen der Zervix fest. Diese Neoplasien seien häufig induziert durch eine Mutation der Tyrosin-Kinase-Domäne (Chang et al. 1999), aber auch durch strukturelle Rearrangements oder Veränderungen der normalen regulatorischen oder inhibierenden Bahnen (Lee et al. 2005, Lee et al. 2004, Marzano et al. 2004). Übereinstimmend stellten Lakshmi et al. (1997), Leung et al. (2001) und Kim et al. (2004) eine erhöhte Expression von EGFR in 70-88% der zervikalen Neoplasien fest (Tabelle 9). Diese schien generell mit einem aggressiveren biologischen Verhalten als in Tumoren mit einer niedrigen EGFR-Expression assoziiert zu sein (Kim et al. 2004, Marzano et al. 2004, Kim et al. 2002, Leung et al. 2001,

Oh et al. 2000, Kristensen et al. 1996, Mandai et al. 1995, Kihana et al. 1994, Oka et al. 1994, Hale et al. 1993, van Dam et al. 1991).

In der vorliegenden Studie konnte zwar ebenso ein gehäuftes Auftreten der EGFR-Expression bei den höheren Tumorstadien festgestellt werden (pT2b 16%, pT≥3 34%), jedoch fand sich diese ebenso in niedrigeren Stadien (pT1b1 37%) ein peak.

Die oben geschilderten, kontroversen Ergebnisse zu der vorliegenden Arbeit könnten unter anderem durch den im Folgenden genannten Grund bedingt sein. Leung et al. (2001) und Biesterfeld et al. (1999) haben neben den stark positiven zusätzlich auch moderate Färbeintensitäten, das heißt Score 2+, in die Wertung einer EGFR-Positivität mit einbezogen, gegensätzlich zur vorliegenden Studie. Möglicherweise ergibt sich deshalb eine derart hohe Expressionsrate von 82,1%, beziehungsweise 70% (siehe Tabelle 9).

Die differenten Ergebnisse in der Literatur sind allerdings nicht auf unterschiedliche Bestimmungsmethoden des EGFR-Status zurückzuführen, da alle in der folgenden Tabelle 9 aufgelisteten Autoren die Immunhistochemie verwendeten.

**Tabelle 9: Ergebnisse der EGFR-Färbeintensität in der Literatur**

<b>Autoren</b>	<b>Fallzahl (n)</b>	<b>FIGO – Stadien</b>	<b>EGFR-Positivität (%)</b>
Vorliegende Studie	73	ab Ib1	19,2
Skomedal et al. (1999)	74	0 bis IVb	20,0
Cho et al. (2003)	84	IIB	26,6
Kersemaekers et al. (1999)	136	I und II	54,0
Biesterfeld et al. (1998)	30	Ia bis IVb	70,0
Kim et al. (2002)	73	ab Ia	71,2
Kim et al. (2004)	68	IIB	72,0
Leung et al. 2001	110	0 bis IVb	82,1
Lakshmi et al. (1997)	388	Ia bis Iva	88,6

\*es wurden nur Patientinnen einbezogen, bei denen eine pTNM-Kategorisierung möglich war

#### **5.4.2. Korrelation von HER-2-Expression mit den primären und rezidierten Zervixkarzinomen**

Es war in der vorliegenden Untersuchung auffallend, dass bei 100% der Fälle keine Färbung darstellbar war. Weder bei den mittels der TMMR-Methodik operierten Patientinnen (0%) noch bei den mit der LEER-Methode therapierten Patientinnen (0%) ist eine HER-2-Überexpression im Sinne eines Score 3+ registriert worden. Diese Feststellung kann nicht mit der Literatur verglichen werden, da aktuell keine Studien ähnlich dem Thema der vorliegenden Arbeit existieren.

Eine Vielzahl von anderen Untersuchern analysierte die HER-2-Antikörper-Reaktivität in zervikalen Neoplasien mit stark variierenden Inzidenzen von 0% bis 90% (Tabelle 10).

In Übereinstimmung mit den vorliegenden Ergebnissen zeigten in einer ähnlichen Studie Roland et al. (1997), dass die Genamplifikation von HER-2 beim Zervixkarzinom offensichtlich keine Rolle spielt. In der retrospektiven Untersuchung von Ravazoula et al. (2006) von 75 Karzinomen der Zervix uteri stellte sich in lediglich 11,7% der Fälle eine positive Färbung auf HER-2 dar. Berchuk et al. (1990) untersuchten zwar nur 26 Patientinnen, jedoch fanden sie in 25 Fällen eine HER-2-Expression, aber diese war nur gering im Sinne eines Score 1. Sie resümierten übereinstimmend mit der vorliegenden Studie, dass eine starke HER-2-Überexpression im Zervixkarzinom in extrem wenigen Fällen auftritt. Chavez-Blanco et al. (2004) konnten in nur einem Fall von 35 untersuchten, ebenso nicht vorbehandelten, Primärtumoren eine Überexpression dieses Rezeptors im Sinne eines Score 3+ feststellen. Alle übrigen Fälle wurden als negativ interpretiert. Nur 2 der insgesamt 4 Rezidive zeigten im Hercep - Test moderate, bzw. starke Färbungen. Das Aufzeigen der Konvertierung zum Hercep Test 2+, bzw. 3+ (moderate und starke Färbung) bei Rezidiven indiziere dennoch die Notwendigkeit, weiterhin die Expression von HER-2 sowohl in Rezidiven als auch in Metastasen von Zervixkarzinomen zu evaluieren (Chavez-Blanco et al. 2004).

Ein möglicher Grund für die Diskrepanzen des HER-2-Status in der Literatur könnte unter anderem sein, dass beispielsweise Rosty et al. (2004) die FISH-Methodik zur Bestimmung der HER-2-Expression anwendeten und nicht wie in der vorliegenden Studie sowie in den meisten der in Tabelle 10 aufgelisteten Untersuchungen, die Immunhistochemie einsetzten.

Eine weitere Ursache für diese unterschiedlichen Angaben der HER-2-Expression ist eventuell, dass zum Beispiel Roland et al. (1997) die Färbung des Zytoplasmas und Leung et al. (2001) die membranständige Färbung als positiv werteten. Andere Autoren wie Lakshmi et al. (1997) bezogen sowohl das Zytoplasma als auch die Membran in ihre Auswertung ein.

Aufgrund der Ergebnisse der vorliegenden Studie lässt sich schlussfolgern, dass die klinische Effektivität der Anti-HER-2-Antikörper in der Therapie der Zervixkarzinome durch die extrem niedrige Frequenz der HER-2-Überexpression vermutlich limitiert ist. Daraus resultierend kann Trastuzumab in dem Fall ein untergeordneter Wert zugeordnet werden.

**Tabelle 10: Ergebnisse der HER-2-Färbeintensität in der Literatur**

<b>Autoren</b>	<b>Fallzahl (n)</b>	<b>FIGO - Stadien</b>	<b>Her-2-Positivität (%)</b>
Vorliegende Studie	73	ab Ib1	0
Berchuk et al. (1990)	26	0 bis IVb	0
Chavez-Blanco et al. (2004)	35	Ib2 bis IIIb	2,9
Kersemaekers et al. (1999)	136	I und II	8,8
Ravazoula et al. (2006)	75	0 bis IVb	11,7
Ravazoula et al. (2006)	150	0 bis IVb	22,0
Bhadauria et al. (2001)	50	Ila bis Iva	26,0
Rosty et al. (2004)	82	Ia bis IV	29,0
Nishioka et al. (1999)	107	0 bis IVb	33,3
Nevin et al. (1998)	126	Ib bis Ila	38,1
Nakano et al. (1997)	64	0 bis IVb	42,4
Niiebe et al. (2003)	21	ab IIIb	42,9

Roland et al. (1997)	15	0 bis IIIb	66,7
Leung et al. (2001)	110	0 bis IVb	87,2
Lakshmi et al. (1997)	388	Ia bis Iva	90,5

#### **5.4.3. COX-2-Expression bei den primären und rezidierten Zervixkarzinomen**

Insgesamt war in der vorliegenden Studie nur bei einem Viertel aller Patientinnen eine positive COX-2-Gewebefärbung im Sinne eines Score 3 darstellbar ( $\geq 75\%$  positive Tumorzellen). Lediglich bei 18,1% der Fälle ist eine Überexpression dieses Entzündungsmediators aufgetreten. Unterteilt nach den TMMR- und LEER-Tumoren ergab sich eine COX-2-Immunpositivität von 27,3% bzw. 21,4% ( $p=0,577$ ). Eine COX-2-Überexpression war bei den TMMR-operierten Karzinomen in 25% und bei den LEER-therapierten Tumoren in nur 7,1% der Fälle nachweisbar ( $p=0,055$ ). Insofern gibt es hier einen nennenswerten, jedoch nicht statistisch signifikanten Unterschied zwischen den beiden erwähnten Operationsmethoden.

In der Literaturrecherche fanden sich keine Untersuchungen, welche die COX-2-Expression, beziehungsweise COX-2-Überexpression mit TMMR- und LEER-Operationen verglichen. Somit ist eine Auswertung mit anderen Studien nicht möglich.

Die Cyclooxygenase-2 wird in einer Vielzahl von malignen Tumoren, sowohl in den eigentlichen Tumorzellen als auch im umgebenden Stroma, exprimiert. Sie reguliert möglicherweise die Angiogenese, weshalb die Inhibierung dieses Entzündungsmediators in der Therapie maligner Neoplasien derzeit in vielen Studien untersucht wird. Die im Karzinomgewebe gebildeten Prostaglandine, vor allem PGE<sub>2</sub>, können dort das Tumorstroma beispielsweise durch Angiogenese und/ oder Immunsuppression beeinflussen (Prescott 2000, Lee et al. 2004, Shi et al. 2006). Aber auch auf die Tumorzellen direkt zeigen die Prostaglandine hinsichtlich Proliferation und Apoptose multiple Effekte (Eichele et al. 2008).

Williams et al. (2000), Prescott (2000) und Sawaoka et al. (1999) führten Studien an Mäusen durch, allerdings meist an Kolonkarzinomen. Alle Autoren

beobachteten durch eine gezielte COX-2-Inhibition eine Hemmung des Malignomwachstums und der Angiogenese. Williams et al. (2000) schlussfolgerten zusätzlich, dass für das Tumorwachstum die Präsenz von COX-2 per se verantwortlich sei und nicht das Karzinom selbst. Das Molekül werde weiterhin nicht in den Endothelzellen, sondern im Tumorstroma exprimiert. Oshima et al. (1996) beobachteten in einem ähnlichen Tierexperiment, ebenso an Kolonkarzinomen, einen gegenteiligen Effekt: die COX-2-Expression fand im Stroma und nicht in den Epithelzellen statt. Somit bleibt die Frage, wo die Expression dieses Moleküls stattfindet, kontrovers diskutiert und unbeantwortet. Weiterhin sind in den oben aufgeführten Studien keine Zervix-, sondern Kolonkarzinome und nur an Tieren untersucht worden. Da die COX-2 auch bei Entzündungsprozessen vermehrt transkribiert wird, ist ein Zusammenhang mit der peritumoralen Entzündung möglich. Auf diesen Aspekt soll an dieser Stelle jedoch nicht näher eingegangen werden, da sich eine ausführliche Diskussion diesbezüglich im Kapitel 5.7. findet.

Nach den Ergebnissen des vorliegenden Studienprofils scheint eine gegen COX-2-gerichtete targeted therapy sowohl bei den Primär- als auch Rezidivtumor des Zervixkarzinoms eher weniger sinnvoll, da jeweils eine zu geringe COX-2-Überexpressionsrate, wie oben ersichtlich, auftrat.

Eichele et al. (2008) vermuten sogar, dass eine COX-2-Inhibierung während einer Chemotherapie deren Effizienz vermindern würde, da die Cyclooxygenase-2 die Tumorzellen für einen apoptotischen Tod sensibilisiere. Somit wären COX-2-Hemmer eher als unterstützende Antitumor-Agenzien, unter anderem zur Schmerzlinderung, und weniger als eigentliche Therapeutika geeignet.

Ryu et al. (2000) kamen in ihrer Studie mit 36 operativ therapierten Zervixkarzinomen mit einem FIGO-Stadium IB zu dem Ergebnis, dass die COX-2-Expression mit dem Lymphknotenstatus oder mit parametralen Infiltrationen korreliert (siehe Tabelle 11). Wahrscheinlich ist die 33,3%ige COX-2-Positivität in deren Untersuchung nur darauf zurückzuführen, dass die Expression dieses Moleküls ausschließlich in Lymphknotenmetastasen bzw. im Tumorgewebe mit mesometralen Infiltrationen zu beobachten war.

Im Gegensatz zum Zervixkarzinom werden bei Malignomen des Magen-Darm-Traktes oder bei Mammakarzinomen derzeit Hoffnungen auf die präventive oder therapeutische Wirkung von COX-2-Inhibitoren in der targeted therapy gesetzt (Prescott 2000). Die COX-2-Hemmer werden aktuell in den klinischen Studien zumeist in Kombination mit anderen Therapeutika genutzt. Einer der beschriebenen Vorteile der targeted therapy der COX-2 bei Gastrointestinal- und Mammakarzinomen sei, dass sowohl die hochvariablen Karzinomzellen, welche bekanntlich sehr schnell einer Therapie entweichen können, als auch das verhältnismäßig invariable Stroma angegriffen werden kann. Dadurch soll sich die Wahrscheinlichkeit einer Resistenzbildung verringern (Kang et al. 2006, Elder et al. 1997, Tsujii et al. 1997).

In der Literatur sind generell nur sehr wenige Studien zu einer Häufigkeit der COX-2-Expression beim Zervixkarzinom zu finden, was einen Vergleich der Resultate dieser Arbeit erschwert. Kim et al. (2004) fanden ebenso bei einem nur geringen Anteil, das heißt in nur 19 von 68 Fällen (27,9%), eine COX-2-Expression. Auf eine Überexpression im Sinne einer Färbeintensität von  $\geq 75\%$  sind die Autoren jedoch nicht eingegangen, sondern es wurden ab  $>10\%$  alle Fälle als COX-2-positiv eingestuft. Weiterhin sind in deren Studie ausschließlich FIGO IIB – Karzinome evaluiert worden, sodass die Vergleichbarkeit zwischen der vorliegenden und der Publikation von Kim et al. (2004) gering ist.

**Tabelle 11: Ergebnisse der COX-2-Färbeintensität in der Literatur**

<b>Autoren</b>	<b>Fallzahl (n)</b>	<b>Tumorstadien</b>	<b>COX-2-Positivität (%)</b>
Vorliegende Studie	73	ab Ib1	18,1
Kim et al. (2004)	68	IIB	28,0
Ryu et al. (2000)	36	IB	33,3

## **5.5. TMMR- und LEER-Methoden in Abhängigkeit von der Tumorausdehnung**

### **5.5.1. Beziehung zwischen EGFR-Expression und Tumorklassifikation**

In dieser Untersuchung konnten zu 19,2% EGFR-positive Tumoren im Sinne eines Score 3 nachgewiesen werden. Davon traten die Stadien pT1b1 mit 29% und pT≥3 mit 36% am häufigsten auf. Bei den schwach, bzw. mäßig positiven Fällen waren die Stadien pT1b1, bzw. pT≥3 mit jeweils 50% ebenso am meisten vertreten. Bei den negativen Färbintensitäten lag die Verteilung der Stadien pT1b1 und pT≥3 bei 40%, bzw. 34%. Ein signifikanter Zusammenhang ließ sich hier jedoch nicht finden ( $p=0,480$ ).

Ebenfalls keine Korrelation zwischen den beiden Parametern EGFR-Expression und Tumorgroße konnten Leung et al. (2001) sowie Kristensen et al. (1996) finden. In Leung's Studie zeigten 82% eine moderate, bzw. starke Expression, bei Kristensen et al. (1996) waren nur 26% der Tumoren EGFR-positiv. Die unterschiedlichen Prozentsätze bei den positiven Tumoren könnten dadurch bedingt sein, dass Kristensen et al. (1996) einen anderen Antikörper mit einer unterschiedlichen Affinität verwendeten. Außerdem wurden in deren Studie nur Stadium Ib-Patienten untersucht.

Ein geringes Vorkommen einer EGFR-Expression bestätigten ebenso Skomedal et al. (1999) in ihrer Untersuchung von 74 Zervixkarzinomen. Die Studiengruppe beobachtete in Tumoren eine vergleichsweise geringe 20%-ige EGFR-Positivität. Es bestanden keine Korrelationen zwischen der Expression dieses Proteins und histologischem Typ, Grading oder Überleben. Hinsichtlich des FIGO-Stadiums zeigte sich zwar eine EGFR-Protein-Akkumulation mit dem Ansteigen der Substadien (FIGO-Stadium I versus II-IV,  $p=0,05$ ), dieser wird jedoch kein unabhängiger prognostischer Wert beigemessen.

Gegensätzlich zu unseren Ergebnissen beobachteten Kim et al. (2002), Kersemaekers et al. (1999), Kim et al. (1996) und Pfeifer et al. (1989), dass Zervixkarzinome mit einer EGFR-Überexpression deutlich aggressiver sind, wenn der Tumordurchmesser größer als 3 cm ist.



Zusätzlich lässt sich laut Kersemaekers et al. (1999) bei einer erhöhten Expression von EGFR in Anwesenheit von Lymphknotenmetastasen auf ein aggressiveres biologisches Verhalten schließen als in Karzinomen mit einer niedrigen EGFR-Expression (Kim et al. 2002, Kersemaekers et al. 1999, Kim et al. 1996, van Dam et al. 1991, Pfeiffer et al. 1989). Hale et al. (1993) berichteten sogar von einer starken Korrelation zwischen der EGFR-Überexpression und Mortalität, insbesondere bei Patientinnen ohne Lymphknotenmetastasen. Auch Kim et al. (2004) und Pfeiffer et al. (1989) halten EGFR für einen Indikator für die biologische Aggressivität eines Zervixkarzinoms.

Biesterfeld et al. (1999) registrierten in einer Studie mit 30 Plattenepithelkarzinomen der Zervix uteri die EGFR-negativen Tumoren (n = 9, 30%) tendenziell in niedrigen Tumorstadien. Demzufolge schließen sie auf eine inverse Korrelation zwischen einer EGFR-Expression und der Tumorausbreitung. Um dies aufzuklären, wären jedoch größere Studiengruppen indiziert.

#### **5.5.2. Beziehung zwischen HER-2-Expression und Tumorklassifikation**

Mit einer Signifikanz von  $p = 0,028$  konnte zu 95% kein Nachweis von HER-2 im Tumorgewebe (Score 0) erbracht werden. Dies betraf vor allem die Stadien pT1b1 mit 38% und pT $\geq$ 3 mit 36%, jedoch waren diese Stadien auch fallzahlenmäßig mit 37%, bzw. 34% am häufigsten vertreten.

Insgesamt variieren die Angaben der Prävalenz einer positiven HER-2-Expression in der Literatur stark mit Werten von 8,8% bis 77% (Leung et al. 2001, Kersemaekers et al. 1999, Kristensen et al. 1996, Costa et al. 1995, Mandai et al. 1995, Kihana et al. 1994, Oka et al. 1994, Hale et al. 1992). Ursächlich dafür können eine Vielzahl an Faktoren wie der Art des verwendeten Antikörpers, der Technik per se und nicht zuletzt an den Kriterien der Färbeintensitäten-Einteilung sein (Chavez-Blanco et al. 2004, Fadare und Zheng 2004, Rosty et al. 2004).

Ähnlich zu der vorliegenden Studie fanden Kersemaekers et al. (1999) in nur 12 von 136 untersuchten Zervixkarzinomen eine geringe Färbung auf HER-2 (Score <3), Kihana et al. (1994) konnten eine Expression in nur 11 von 44

Tumoren nachweisen, zusätzlich verbunden mit einer schlechteren Prognose. Ebenso zeigten bei Oka et al. (1994) 19% und bei Berchuck et al. (1990) sogar nur 4% der Patientinnen im FIGO-Stadium IVb eine HER-2-Überexpression.

Ndubisi et al. untersuchten bereits im Jahre 1997 150 Zervixkarzinome, von denen 34 (22%) HER-2 exprimierten. Zwischen der HER-2-Expression und der Überlebensrate ergaben sich keine signifikanten Unterschiede ( $p < 0,001$ ).

In einer weiteren Studie über die immunhistochemische HER-2-Expression an 50 Fällen von Bhadauria et al. (2001) waren ca. 20% der Fälle für HER-2 positiv. Somit konnten Bhadauria et al. (2001) ebenso über keinen statistischen Zusammenhang zwischen einer immunopositiven Reaktion auf HER-2 und einer Therapieantwort berichten.

Rosty et al. (2004) stellten bei 24 (29%) von 82 Karzinomen eine HER-2-Präsenz fest, aber nur 2 Tumoren (2%) zeigten eine Färbung von mehr als 60% der Zellen und wurden damit als positiv für eine Überexpression gewertet. Eine Korrelation zwischen der HER-2-Färbung und klinischem Stadium, histologischem Typ oder Alter bestand nicht.

Somit sind viele Autoren mit unserer Meinung konform, dass eine Überexpression von HER-2 im invasiven Zervixkarzinom untypisch ist und dass daraus resultierend keine Indikation für die Therapie mit Trastuzumab für Zervixkarzinom-Patientinnen besteht.

Dennoch seien an dieser Stelle andere Studiengruppen aufgeführt, die zumindest vermehrt HER-2-Überexpressionen im Zervixkarzinom nachweisen konnten. Hale et al. (1992) berichtete von einer HER-2-Überexpression bei 45% der von ihnen untersuchten 62 Tumoren im Stadium IB/ IIA. Nakano et al. (1997) fanden eine Immunopositivität auf der Zellmembran bei 42,4% seines insgesamt 64 Karzinome umfassenden und über alle klinischen Stadien hinweg verteilten Patientengutes. Die HER-2-Expression stieg hier signifikant mit der Progression des Stadiums an. Lakshmi et al. (1997) konnten sogar eine HER-2-Expression in 90,5% der Fälle sowie eine signifikante Korrelation zwischen der Expression der EGFR- und HER-2-Proteine nachweisen. Auch bei Leung et al. (2001) zeigten von 81 Patientinnen 87,2% eine moderate/ starke Expression dieses Protoonkogens. Im Vergleich von HER-2 und EGFR war auffällig, dass

HER-2 in normalen Geweben signifikant häufiger eine moderate, bzw. starke Expression ( $p=0,007$ ) aufwies als EGFR, im Tumorgewebe wurde jedoch signifikant häufiger EGFR moderat, bzw. stark exprimiert ( $p=0,008$ ). Niiibe et al. (2003) und Soh et al. (2002) schlussfolgerten aus ihren Ergebnissen, dass HER-2 mit der Tumorgroße korreliere. Costa et al. (1995) berichteten, dass eine Überexpression dieses Biomarkers nur in fortgeschrittenen Stadien erscheint. Die Differenzen der HER-2-Überexpressionsrate in der im vorigen Abschnitt aufgeführten Literatur könnten möglicherweise durch die unterschiedlichen Stadien des untersuchten Patientengutes bedingt sein. Denn während einige Autoren Patientinnen über alle Stadien hinweg inkludierten, konzentrierten sich andere nur auf frühe oder fortgeschrittene Stadien. Weiterhin sind in mehreren oben erwähnten Studien andere Antikörper mit unterschiedlichen Affinitäten in der Immunhistochemie eingesetzt worden, wodurch ebenso unterschiedliche Prozente entstanden sein könnten. Möglicherweise spielt auch die Auswahl von entweder mono- oder polyklonalen Antikörpern eine Rolle. Zusätzlich können verschiedene Methoden der Präparation und Fixation der Proben sowie unterschiedlich untersuchte histologische Typen des Zervixkarzinoms eine Rolle spielen. Nicht zu vergessen sind die noch weiter unten ausführlicher erwähnten, differenten Interpretationsmethoden der immunhistochemischen Färbung.

### **5.5.3. Beziehung zwischen COX-2-Expression und Tumorklassifikation**

In der vorliegenden Untersuchung bestand kein signifikanter Zusammenhang ( $p = 0,995$ ) zwischen dem pT-Stadium der Karzinome und ihrer COX-2-Färbeintensität. Insgesamt 32% der Tumoren waren COX-2-negativ. Hier war der größte Anteil in den Stadien pT1b1 mit 36% und  $\geq$ pT3 mit 35% zu finden. Dabei fiel auf, dass im Stadium pT2b am häufigsten (34%) COX-2-positive Tumoren und im Stadium  $\geq$ pT3 die wenigsten COX-2-positiven Fälle (18,8%) auftraten.

In einer Studie mit 55 fortgeschrittenen, mit Radiotherapie behandelten Zervixkarzinomen von Gaffney et al. (2003) zeigte sich eine signifikante, direkte

Korrelation zwischen COX-2 und Tumorgröße, bzw. klinischem Stadium. Die Studiengruppe stellte fest, dass eine verstärkte Färbung von COX-2 eine diminuierte krankheitsfreie Überlebenszeit und somit eine ungünstigere Prognose impliziert. Demzufolge komme der erhöhten COX-2-Expression eine Funktion als prognostische Determinante zu. Auch andere Studien stellten eine Korrelation der COX-2-Expression mit Tumorgröße sowie Lymphknotenstatus und Sterberate fest (Ferrandina et al. 2002 und 2004, Kim et al. 2002, Gaffney et al. 2001, Ryu et al. 2000). Die von Gaffney et al. (2003) ermittelte Signifikanz ist in ihrer Aussagekraft in unseren Augen fraglich, da dieses Studienprofil extrem geringe Fallzahlen beinhaltet. Die Widersprüchlichkeit unserer Resultate zu denen von Gaffney et al. (2003) könnte zudem auch dadurch bedingt sein, dass deren Patientengut im Gegensatz zu dem unseren mittels Radiotherapie vorbehandelt wurde.

#### **5.6. Vergleich der Rezidive mit Invasionsmuster, Desmoplasie, peritumoraler Entzündung, Lymphbahneinbrüchen, EGFR-, COX-2- und HER-2-Färbung**

Es wurde in dieser Arbeit untersucht, ob die histopathologischen Parameter Invasionsmuster, Desmoplasie, peritumorale Entzündung und Lymphbahneinbrüche sowie nicht zuletzt die EGFR-, COX-2- und HER-2-Expressionen potentielle Einflussfaktoren auf das Auftreten von Rezidiven sind. Statistisch signifikante Zusammenhänge konnten in Bezug auf keinen der oben genannten Parameter ermittelt werden.

Ndubisi et al. (1997) schlussfolgerten aus ihrer Untersuchung, in der eine HER-2-Überexpression in Übereinstimmung mit unseren Erkenntnissen ebenso ein sehr seltenes Ereignis im Zervixkarzinom ist, dass dieses Protoonkogen nicht als Vorhersagewert für ein höheres Risiko eines Rezidivauftritts dient. Entgegen dieser Meinung zeigten multiple Studien, dass bis zu 77% der Zervixkarzinome diesen Rezeptor überexprimieren, insbesondere in Adeno- und adenosquamösen Karzinomen (Lee et al. 2008, Niibe et al. 2003, Leung et

al. 2001, Kersemaekers et al. 1999, Nishioka et al. 1999, Kristensen et al. 1996, Kihana et al. 1994, Oka et al. 1994). Costa et al. (1995) postulierten, dass eine HER-2-Immunoreaktivität signifikant assoziiert ist mit einem gehäuftem Auftreten von Rezidiven. Auch Soh et al. (2002) konnten in einer verhältnismäßig großen Studie mit 275 Patienten einen Zusammenhang von HER-2 mit der Rezidiventwicklung nachweisen. Allerdings ist die Richtigkeit, bzw. Genauigkeit dieser Ergebnisse anzuzweifeln, da im Gegensatz zu der vorliegenden Arbeit nicht-standardisierte Testmethoden für eine HER-2-Überexpression angewendet worden sind. In der Mehrheit der oben genannten klinischen Studien sind Adenokarzinome evaluiert worden. In der Studien-Population dieser Arbeit bestand die Mehrheit der Tumoren aus Plattenepithelzell-Karzinomen und könnte zusätzlich für die Unterschiede der Korrelationen der Biomarker verantwortlich sein.

Höckel et al. (2003) beschreiben ein gehäuftes Auftreten von Rezidiven nach der konventionellen radikalen Hysterektomie. Bei dieser Operation werde das Mesometrium mit dem Parametrium/ Parakolpium mittels traumatischer Instrumente, sogenannten Wertheim-Klemmen, vor der Transektion adaptiert. Dadurch bedingt könnten Reste des Mesometriums, welches möglicherweise noch Tumorzellen enthalten könnte, in oder nahe der sekundären Wunden zurück bleiben. Diese versteckten Tumorreste sind in den Augen der Autoren die Ursache für die Mehrheit der pelvinen Rezidive. Bei den mittels der TMMR operierten Patientinnen konnten Höckel et al. (2003) nur bei einem von 71 Fällen eine R1-Situation eruieren, weniger Rezidive beobachten, sowie eine deutliche Senkung der Komplikationsraten.

## **5.7. Überlebensanalyse**

Diesem Kapitel ist voranzustellen, dass sich in dieser Untersuchung ein sehr deutlicher, hochsignifikanter Unterschied ( $p < 0,00001$ ) zwischen den TMMR- und LEER-therapierten Zervixkarzinomen für das Überleben herausstellte. Alle eingetretenen Todesfälle ( $n=10$ ) sowie Fernmetastasen ( $n=2$ ) im

Beobachtungszeitraum sind ausschließlich bei den LEER-operierten Patientinnen vorgekommen. Nicht unbedeutend ist hierbei, dass an der Universitätsfrauenklinik Leipzig die Primärtumoren mittels der TMMR-Technik und die Rezidivkarzinome mit Hilfe der LEER-Variante operiert werden. Die wesentlich bessere Prognose der Primärtumoren scheint demnach mitunter von dem neuen, innovativen und der Patientin gegenüber schonenden Operationskonzept der totalen mesometrialen Resektion (TMMR) zu profitieren. Weiterhin fiel auf, dass insgesamt am häufigsten zum Ende des Beobachtungszeitraumes eine Remission der Tumoren (NED=no evidence of disease) festgestellt wurde. So waren 46,5% (n=13) der LEER- und sogar 95,5% (n=44) der TMMR-operierten Neoplasien zum Zeitpunkt der letzten Nachricht tumorfrei (NED).

#### **5.7.1. Prognostische Relevanz der EGFR-Expressionsrate**

Für die LEER-therapierten Tumoren ergab sich in der vorliegenden Untersuchung ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Überleben und der EGFR-Expression ( $p=0,034$ ), nicht aber für die TMMR-operierten Karzinome ( $p=0,495$ ). Die Expressionsrate dieses Onkoproteins war bei den TMMR- und LEER-Patientinnen gleichermaßen gering mit 18,2% bzw. 21,4% der Fälle.

Anhand der Ergebnisse dieser Untersuchung bleibt die prognostische Relevanz dieses Moleküls fraglich. Auch in der Literatur wird trotz vieler intensiver Studien der prognostische Wert der EGFR-Überexpression beim Zervixkarzinom in der Literatur kontrovers diskutiert (Cho et al. 2003, Scambia et al. 1998, Hale et al. 1993). In Übereinstimmung mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit konnten beispielsweise Ngan et al. (2001), Nagai et al. (2000), Skomedal et al. (1999), Kim et al. (1999) und Scambia et al. (1998) keine prognostische Relevanz des EGFR – Nachweises beobachten.

Aber auch einige kontroverse Resultate, bei denen die EGFR-Immunoreaktivität mit einer schlechten Prognose assoziiert war, stellten mehrere Studiengruppen fest (Kim et al. 2004, Marzano et al. 2004, Cho et al. 2003, Kim et al. 2002,

Kersemakers et al. 1999, Kim et al. 1996, Kristensen et al. 1996, Pfeifer et al. 1989). Obwohl Tumorausdehnung und Lymphknotenmetastasen die entscheidenden Prognosen für das Überleben liefern, stellt dieses Molekül für Cho et al. (2003) trotzdem einen potenten molekularen Risikofaktor dar. Zu demselben Schluss kamen auch Kim et al. (2004), Marzano et al. (2004), Gaffney et al. (2003), Suo et al. (2002), Kersemakers et al. (1999), Todd et al. (1999), Kristensen et al. (1996) sowie Hale et al. (1993). Diese Diskrepanzen zur vorliegenden Studie könnten unter anderem auch dadurch bedingt sein, dass beispielsweise Cho et al. (2003) Plattenepithelkarzinome ausschließlich mit einem FIGO-Stadium IIB untersuchten, die zudem noch im Gegensatz zu den unseren mit Radio- und gleichzeitiger Chemotherapie vorbehandelt wurden.

Gaffney et al. (2003) untersuchten in einer retrospektiven Studie 55 fortgeschrittene, mit Radiotherapie behandelte Zervixkarzinome. Es ergab sich, dass auch hier neben dem Stadium die EGFR-Färbeintensität ( $p < 0,037$ ) für das Überleben signifikant waren. Weiterhin wiesen Patientinnen mit einer erhöhten EGFR-Expression eine erhöhte Sterberate und somit eine schlechtere Prognose auf. Auch Lee et al. (2004) stellten eine Signifikanz für ein reduziertes generelles Überleben in Abhängigkeit von einer erhöhten EGFR-Färbeintensität ( $p \leq 0,043$ ) fest. Marzano et al. (2004), Kristensen et al. (1996) und Hale et al. (1992) berichteten von einer Assoziation dieses Biomarkers mit der Tumoraggressivität oder der Überlebensrate, ganz besonderes im frühen Krankheitsstadium.

In Bezug auf die EGFR-Expression stehen unsere Resultate jedoch in Widerspruch zu den vorigen Studien, welche eine höhere EGFR-Expressionsrate observierten. Diese Diskrepanz könnte dadurch zu erklären sein, dass beispielsweise Gaffney's Tumoren im Gegensatz zu den unseren mit Radiotherapie vorbehandelt worden sind.

Kersemakers et al. (1999) wiesen bei der Hälfte (54%) aller 136 untersuchten Zervixkarzinome eine moderate, bzw. starke EGFR-Expression nach. Diese war hochsignifikant assoziiert mit einem reduzierten krankheitsfreien Überleben

( $p < 0,002$ ) und einem generellen Überleben ( $p < 0,003$ ). Die Autoren resümieren, dass die EGFR-Überexpression ein unabhängiger Prädiktor für die Prognose in frühen Stadien, explizit Stadium I und II, ist. Dem sei jedoch hinzugefügt, dass in deren Studie ausschließlich Tumoren der FIGO-Stadien I und II untersucht worden sind.

Kim et al. (2002) konnten keine signifikanten Beziehungen finden, obwohl in allen 73 untersuchten Tumoren EGFR präsent war. Sie wiesen die Höhe der EGFR-Expression eine prognostische Bedeutung zu. Je höher die EGFR-Expression wäre, umso aggressiver und proliferativer seien die Zervixkarzinome. Zusätzlich fanden die Autoren bei drei ihrer fünf Studiengruppen eine signifikante Beziehung zwischen dem EGFR-Status und der 5-Jahres-Überlebensrate, bzw. der generellen Überlebensrate.

Diese zur vorliegenden Studie differenten Ergebnisse könnten darin bedingt sein, dass der EGF-Rezeptor mittels des Enzyme-linked Immunosorbent Assay's (ELISA) anstelle eines immunhistochemischen Verfahrens nachgewiesen worden ist.

Wie aus den obigen Ausführungen ersichtlich, gibt es auch hier verschiedene Resultate hinsichtlich des prognostischen Wertes einer EGFR-Überexpression in den Publikationen. Eine verschlechterte Prognose stellten zum einem Lee et al. (2004), Marzano et al. (2004), Kedzia et al. (2002), Kim et al. (2002), Oh et al. (2000), Kersemaekers et al. (1999) und Hale et al. (1993), Ostor et al. (1993) fest.

Noordhuis et al. (2011) konnten ebenso berichten, dass die Existenz des epidermal growth factor receptor (EGFR) bei Zervixkarzinompatientinnen zu einer verschlechterten Prognose sowie Therapieantwort führt.

Zum anderen publizierten (Leung et al. 2001, Ngan et al. 2001, Scambia et al. 1998, Kristensen et al. 1996), dass keine statistisch signifikante Korrelation mit einer schlechteren Prognose einhergeht.



### **5.7.2. Prognostische Relevanz der HER-2-Expressionsrate**

Die vorliegende Untersuchung konnte hier keine relevanten Aussagen liefern, da alle mittels der TMMR- und der LEER-Methode resezierten Zervixkarzinome zu jeweils 100% HER-2-negativ waren und somit kein Vergleich zwischen HER-2-positiven und HER-2-negativen Gruppen möglich war. Da jedoch die Expressionsrate des Moleküls in diesem Fall bei null lag, ist von keinem bis sehr geringen Prognosewert des HER-2 auszugehen.

Auch andere Forschungsgruppen konnten keine statistisch signifikante Korrelation mit einer ungünstigeren Prognose feststellen (Leung et al. 2001, Ngan et al. 2001, Scambia et al. 1998, Ndubisi et al. 1997, Kim et al. 1996, Kristensen et al. 1996).

In Übereinstimmung mit dieser Arbeit zeigten auch viele andere Studien sehr niedrige HER-2-Expressionsfrequenzen. So konnten auch Rosty et al. (2004) in einer Studie mit 82 Fällen in nur 2% eine Überexpression von HER-2 nachweisen. Von ähnlichen Resultaten berichteten Bellone et al. (2003) sowie Fadare und Zheng (2004), welche eine wesentlich größere TMA-Datenbasis mit 169 Fällen als Grundlage verwendeten. Nur 2 Patientinnen (<1%) zeigten eine stark positive Farbreaktion auf HER-2, die restlichen waren negativ (Score 0). Ähnlich zu den Ergebnissen der vorliegenden Studie zweifeln die o.g. Autoren an, dass der humane monoklonale Antikörper Herceptin (Trastuzumab) als effektives therapeutisches Mittel gegen das Zervixkarzinom in der nahen Zukunft dienen wird.

Da dennoch ein sehr geringer Anteil der Zervixkarzinome das HER-2-Protein überexprimiert und die Behandlung sich immer weiter auf eine individuell angepasste Therapie, basierend auf dem genomischen, bzw. proteomischen Profil des Patienten, hinaus läuft, können diese Forschungen trotz alledem zumindest für diese Einzelfälle immer wichtiger werden.

Aufgrund dessen soll an dieser Stelle auf einige Studien eingegangen werden, bei denen die Autoren von einer Assoziation des Protoonkogens mit der Überlebensrate oder der Tumoraggressivität berichten (Ravazoula et al. 2006, Leung et al. 2001, Kersemaekers et al. 1999, Nevin et al. 1999, Nishioka et al.

1999, Ndubisi et al. 1997, Kristensen et al. 1996, Mandai et al. 1995, Kihana et al. 1994, Oka et al. 1994, Hale et al. 1992). Eine HER-2-Überexpression sei ein Vorhersagewert für die Überlebensrate und gehe mit einer verschlechterten Prognose einher (Lee et al. 2005, Chavez-Blanco et al. 2004, Lee et al. 2004, Niibe et al. 2003, Kedzia et al. 2002, Oh et al. 2000, Chang et al. 1999, Kersemaekers et al. 1999, Nishioka et al. 1999, Nakano et al. 1997, Kim et al. 1996). Diese These wurde in der Literatur häufig für die FIGO - Stadien II und III belegt (Costa et al. 1995, Mandai et al. 1995, Oka et al. 1994 und Kihana et al. 1994, van Dam et al. 1991 und Pinion et al. 1991). Aber auch in den niedrigeren Stadien Ib und IIa wird über eine solche Korrelation berichtet (Hale et al. 1992). Nishioka et al. (1999) postulierten, dass HER-2-positive Tumoren eine signifikant schlechtere Prognose ( $p < 0,019$ ) vorweisen und dass diese aber nicht vom Krankheitsstadium oder der Tumorgröße beeinflusst werden. Es steige jedoch die HER-2-Positivität per se mit fortgeschrittenem Krankheitsstadium signifikant an ( $p < 0,034$ ).

Gegensätzliche Ergebnisse lieferten Lee et al. (2004). Hier waren ein erhöhtes FIGO-Stadium und eine niedrige HER-2-Expression signifikant für ein diminuiertes krankheitsfreies und generelles Überleben ( $p \leq 0,0001$ , bzw.  $p = 0,002$ ). Nishioka et al. (1999) legten nach 107 untersuchten Zervixkarzinomen dar, dass HER-2-positive Tumoren von einem hochsignifikant schlechterem metastasen- und rezidivfreien Überleben betroffen sind ( $p < 0,001$ ). Dies treffe insbesondere zu, je fortgeschrittener das Krankheitsstadium, bzw. die Tumorgröße sind (Rosty et al. 2003, Nishioka et al. 1999, Costa et al. 1995, Kihana et al. 1994). Gegenätzlich dazu berichtet die japanische Studiengruppe von Nakano et al. (1997), dass die HER-2-Expression nur prognostischen Einfluss auf lokale Rezidive, nicht aber auf Fernmetastasen hat.

### **5.7.3. Prognostische Relevanz der COX-2- Expressionsrate**

In dieser Studie war die Frequenz einer positiven COX-2-Expressionsrate sowohl bei den primären Neoplasien mit 27,9% als auch bei den Rezidiven mit 21,4% insgesamt gering.

Die Bedeutung der Cyclooxygenase-2 im Zervixkarzinom bleibt in der Literatur kontrovers diskutiert. Da einige Forschungsgruppen im Gegensatz zu den Resultaten der vorliegenden Arbeit von einer prognostischen Relevanz des Onkoproteins bei COX-2-positiven Zervixkarzinomen berichten, seien im Folgenden jene Studien aufgeführt.

Eine COX-2-Überexpression sei nicht nur ein Indikator für die Invasivität sowie Aggressivität eines Tumors, sondern auch ein Prädiktor für das metastatische Potential in verschiedenen Tumortypen (Williams et al. 2000, Tsujii et al.1997, Tsujii et al.1995), inklusive des Zervixkarzinoms (Kim et al. 2004, Gaffney et al. 2001, Harari et al. 2000, Ryu et al. 2000).

Kim et al. (2004) stellten fest, dass eine COX-2-Expression einher geht mit einer schlechteren Therapieantwort auf die Standard-Radio-Chemotherapien und einer ungünstigeren Prognose, unabhängig vom histologischen Typ des Zervixkarzinoms. Dies unterstreiche die Wichtigkeit des COX-2-Proteins in der Akquisition der biologischen Aggressivität und erhöhten Therapieresistenz. Aufgrund der Ergebnisse dieser Autoren seien COX-2-positive Patienten adäquate Kandidaten für die zukünftige Erprobung von Therapien verbunden mit selektiven COX-2-Inhibitoren. Dieselbe Meinung vertreten auch Noordhuis et al. (2011), denn die Autoren assoziieren die Cyclooxygenase-2 mit einer schlechten Prognose aufgrund deren Involvierung in die Angiogenese und Hypoxie. Laut Ishikawa et al. (2006) beeinflusst die Cyclooxygenase-2 Zervixkarzinome insofern, als dass diese mehr therapierefraktär auf Bestrahlungen reagieren durch Inhibierung der strahleninduzierten Apoptose. Zudem sei dieses Onkoprotein ein geeigneter Indikator, um die lokale Tumorkontrolle nach einer Radiotherapie zu prognostizieren. Eichele et al. (2008) beobachteten einen COX-2-abhängigen Apoptosemechanismus bei Chemotherapeutika in Zervixkarzinomen, aber auch in Lungenkarzinomzellen.

Das Molekül sensibilisiere die Tumorzellen für einen apoptotischen Tod. Daraus resultierend würde eine COX-2-Inhibierung während einer Tumorthherapie dessen Effizienz diminuieren.

Mehrere Autoren berichten, dass eine COX-2-Inhibition die Radiosensitivität erhöht ohne das normale Gewebe signifikant zu beeinflussen (Gallo et al. 2000, Kishi et al. 2000, Milas et al. 1999). Dies ist ein interessanter Ansatz für zukünftige Therapien, denn somit scheint eine Inhibition der COX-2 in der Behandlung der Zervixkarzinome in Kombination mit einer Radiatio sinnvoll zu sein und geeigneter als eine targeted therapy. Masferrer et al. (2000), Kishi et al. (2000), Williams et al. (2000), Gallo et al. (2000) und Milas et al. (1999) zeigten in ihren Untersuchungen zusätzlich, dass eine solche Inhibierung die Angiogenese in Tumoren vermindert und die Zellen für eine Bestrahlung sowohl in vitro als auch in vivo sensitiviert.

Weiterhin wurde von Ferrandina et al. (2003) und Gaffney et al. (2001) mit der COX-2-Expression eine schlechte Antwort der Zervixkarzinome auf neoadjuvante Chemotherapien sowie eine erhöhte Mortalität in Zusammenhang gebracht. In ihrer aktuellsten Studie von 2011 belegen Ferrandina et al. erneut, dass Zervixkarzinompatientinnen mit einer COX-2-Expression eine kürzere krankheitsfreie Überlebenszeit sowie eine kürzere generelle Überlebenszeit zeigten.

## **5.8. Peritumorale Entzündungsreaktion**

Da von den drei untersuchten Molekülen lediglich die COX-2- als Enzym im Prostaglandin-Stoffwechsel in Entzündungsprozesse involviert ist, soll in diesem Kapitel nur auf dieses Onkoprotein eingegangen werden.

Insgesamt waren 75% der Fälle COX-2-negativ, bei welchen knapp zur Hälfte (48%) geringe inflammatorische Begleitprozesse registriert worden sind. Bei den 25% der COX-2-positiven Tumoren waren die Inflammutationsgrade relativ gleichmäßig verteilt.

Für die Rate der Überexpression dieses Moleküls gibt es keinen einheitlichen, international akzeptierten Cut-off-Wert. Aufgrund dessen wurde in dieser Studie ein Wert von  $\geq 75\%$  als Überexpression definiert. Nur 18,1% aller untersuchten Zervixkarzinome zeigten eine Überexpression dieses Enzyms.

Es konnte weder ein Zusammenhang der COX-2-Überexpression mit der Stärke der peritumoralen Entzündung noch eine Bedeutung als Prognosefaktor dieser Parameter in dieser Arbeit gefunden werden.

Kontroverse Resultate fanden Horn et al. (2001). Laut den Autoren scheint das komplette Fehlen einer peritumoralen Entzündung, bzw. eine Unterteilung in geringe- versus hochgradige entzündliche Begleitreaktionen von prognostischer Bedeutsamkeit hinsichtlich einer aggressiven Tumorbilogie zu sein. Gauthier et al. (1985) stellten bei operierten Zervixkarzinomen des FIGO-Stadium IB eine höhere 5-Jahresüberlebensrate fest, wenn die Inflammation um die Tumorregion mittel – bis hochgradig und nicht geringgradig war.

Prescott (2000) beobachtete in einer Studie an Kolonkarzinomen, dass in höheren Tumorstadien die COX-2 in Entzündungszellen oder in der Nähe des Malignoms zu finden ist.

In der vorliegenden Arbeit waren die meisten Patientinnen zum Zeitpunkt des letzten follow-ups tumorfrei. Sie zeigten gleichzeitig am häufigsten negative Expressionsraten, sodass sich letztendlich anhand dieser Untersuchung keine klare Aussage treffen lässt, inwiefern die peritumorale Entzündung die Überlebensraten beeinflusst.

## **6. Zusammenfassung**

Bis circa 2001 war die Standardtherapie für Zervixkarzinome entweder die Operation und/ oder Radiotherapie. Mit dieser Behandlung entwickelte jedoch eine beachtliche Anzahl von Patientinnen mit lokal fortgeschrittener Krankheit Rezidive und sie starben an der Erkrankung. Durch den Einsatz der neuen Operationsvariante der TMMR-Methodik für Primärtumoren wurde die Rate deutlich gesenkt.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Häufigkeit einer EGFR-, HER-2- sowie COX-2-Expression bei 45 TMMR-operierten Primärtumoren der Zervix uteri und bei 28 LEER-operierten Rezidiv - Zervixkarzinomen untersucht. Bei diesen sind zusätzlich für eine Überlebensanalyse histologische Charakteristika ausgewertet worden. Dazu wurden aus Paraffin-Gewebeschnitten der Primär- und Rezidivtumoren Stanzbiopsien angefertigt und diese in Tissue – Microarray –Blöcke eingebracht, an denen die immunhistochemische Darstellung von EGFR-, HER-2 und COX-2 erfolgte. Die klinischen Angaben wurden den Krankenakten entnommen.

Aus den Untersuchungen ergab sich, dass die Prognosefaktoren vor allem Stadium, Lymphknotenmetastasen sowie Rezidive inkludieren und in nur geringem Umfang die EGFR-, HER-2- und COX-2-Expression sowie histologische Faktoren wie Präsenz einer tiefen Invasion in das zervikale Stroma, Desmoplasie, Grading, peritumorale Entzündung und Lymphgefäßinvasion.

Durch die Anwendung der TMMR-Operationsmethode erlitten nur 6,8% der Fälle ein Rezidiv. Den LEER-operierten Patientinnen hingegen wurde zu 42,9% ein Rezidiv diagnostiziert. Weiterhin sind im Untersuchungszeitraum dieser Studie Fernmetastasen und Todesfälle ausschließlich bei den LEER-therapierten Fällen aufgetreten.

Da bei den in dieser Studie untersuchten Tumoren nur bei 19% eine EGFR-, bei 0% eine HER-2- und bei nur 25% eine COX-2-Expression nachweisbar war, sind insbesondere die ersten beiden genannten Parameter keine Target –

Moleküle für eine individualisierte, zielgerichtete Therapie beim Zervixkarzinom. Eventuell könnte die Cyclooxygenase-2 eine Rolle bei der Prädiktion der Therapieantwort auf eine alleinige Radiatio, bzw. eine kombinierte Radio – Chemotherapie beim Zervixkarzinom spielen.

In der Literatur gibt es jedoch differente Ergebnisse der EGFR-, HER-2- und COX-2-positiven Karzinome. Hier ist ein wichtiger Aspekt, dass viele Untersuchungen nur eine geringe Anzahl von Patienten inkludierten. Es sollten weiterführende Untersuchungen mit größeren Patientengruppen erfolgen, um mit statistischen Signifikanzen aussagekräftigere Beweise zu erbringen.

Weiterhin sollten im Hinblick auf die unterschiedlichen Ergebnisse die zum Teil fehlenden standardisierten Methoden zur Bestimmung sowohl des EGFR-, des HER-2- als auch des COX-2-Status nicht außer Acht gelassen werden. Denn deren Expression ist mittels verschiedener Methoden untersucht worden: Immunhistochemie, Radioliganden-bindende Assays, bzw. Radio-Immunoassays, Genamplifikation, Enzym - Immunoassays und (Multiparameter-) Durchflusszytometrie.

Zusätzliche, mögliche Gründe für die Differenzen der Beobachtungen inkludieren, dass sehr häufig unterschiedliche histologische Typen untersucht worden sind. Während sich etliche Studien nur auf Plattenepithelkarzinome oder Adenokarzinome konzentrierten, so richteten viele Autoren ihr Hauptaugenmerk auf alle histologischen Typen des Zervixkarzinoms.

Ebenso existieren differente Interpretationsmethoden der Expression und/ oder Definition für diese Protoonkogene. Die Einschätzung beim Scoring, ab wann Färbungen als positiv in der Immunhistochemie zu bewerten sind, unterliegt subjektiven Kriterien des Untersuchers und ist mit Sicherheit zumindest teilweise verantwortlich für diese oben aufgeführten Diskrepanzen.

Abschließend sollten auch die möglichen verschiedenen Behandlungsstandards an den jeweiligen Instituten nicht unerwähnt bleiben, denn eventuell könnten auch Vorbehandlungen wie Chemo-, Radio- oder auch kombinierte Radio - Chemotherapien die Expressionen beeinflusst haben.

Die Überexpression aller drei untersuchten Moleküle ist nach den Ergebnissen dieser Studie jeweils ein seltenes Ereignis im Zervixkarzinom. Somit dient die immunhistochemische Detektion einer Expression dieser Onkogene weder der Vorhersage der Überlebensraten, noch können damit Patienten-Subgruppen mit einem höheren Risiko identifiziert werden. Subsumiert repräsentieren diese Biomarker kein zukünftiges Target für eine monoklonale Antikörper - gesteuerte Therapie des Zervixkarzinoms.



## 7. Literaturverzeichnis

1. Alkushi, A., Irving, J., Hsu, F., Dupuis, B., Liu, C. L., Rijn, M., and Gilks, C. B.: "Immunoprofile of cervical and endometrial adenocarcinomas using a tissue microarray"; *Virchows Arch.*, 2003, 442(3):271-277
2. Angel, C., DuBeshter, B., and Lin, J. Y.: "Clinical presentation and management of stage I cervical adenocarcinoma: a 25 year experience"; *Gynecol.Oncol.*, 1992, 44(1):71-78
3. Arteaga, C. L.: "ERBB receptors in cancer: signaling from the inside"; *Breast Cancer Res.*, 2011, 13(2):304
4. Bartlett, J., Mallon, E., and Cooke, T.: "The clinical evaluation of HER-2 status: which test to use?"; *J.Pathol.*, 2003, 199(4):411-417
5. Battifora, H.: "The multitumor (sausage) tissue block: novel method for immunohistochemical antibody testing"; *Lab Invest.*, 1986, 55(2):244-248
6. Bayo-Calero, J. L., Mayordomo, J. I., Sanchez-Rovira, P., Perez-Carrion, R., Illaramendi, J. J., Garcia-Bueno, J. M., Gonzalez-Flores, E., Crespo, C., Ramos-Vazquez, M., Garcia-Palomo, A., Ruiz-Borrego, M., de la, Haba J., Gomez-Bernal, A., and Yubero-Esteban, A.: "A phase II study of weekly vinorelbine and trastuzumab in patients with HER2-positive metastatic breast cancer"; *Clin.Breast Cancer*, 2008, 8(3):264-268
7. Beckmann, M. W., Niederacher, D., Schnurch, H. G., and Bender, H. G.: "[The erbB gene family: significance for tumor development, prognosis and new therapeutic modalities]"; *Geburtshilfe Frauenheilkd.*, 1993, 53(11):742-753
8. Bellone, S., Palmieri, M., Gokden, M., Joshua, J., Roman, J. J., Pecorelli, S., Cannon, M. J., and Santin, A. D.: "Selection of HER-2/neu-positive tumor cells in early stage cervical cancer: implications for Herceptin-mediated therapy"; *Gynecol.Oncol.*, 2003, 91(1):231-240
9. Benedet, J. L.: "Progress in gynecologic cancer detection and treatment"; *Int.J.Gynaecol.Obstet.*, 2000, 70(1):135-147
10. Benedet, J. L.: "Progress in gynecologic cancer detection and treatment"; *Int.J.Gynaecol.Obstet.*, 2000, 70(1):135-147
11. Benedet, J. L. and Cabero-Roura, L.: "Strategies for the modification of risk factors in gynecological cancers"; *Eur.J.Gynaecol.Oncol.*, 2002, 23(1):5-10

12. Benedetti-Panici, P., Greggi, S., Colombo, A., Amoroso, M., Smaniotto, D., Giannarelli, D., Amunni, G., Raspagliesi, F., Zola, P., Mangioni, C., and Landoni, F.: "Neoadjuvant chemotherapy and radical surgery versus exclusive radiotherapy in locally advanced squamous cell cervical cancer: results from the Italian multicenter randomized study"; *J.Clin.Oncol.*, 2002, 20(1):179-188
13. Benton, E. C. and Arends, M. J.: "Human papillomavirus in the immunosuppressed"; In: Lacey, C.(Ed.), *Papillomavirus Reviews: Current REsearch on Papillomaviruses*. Leeds University Press, Leeds, 1996, ):271-279
14. Berchuck, A., Rodriguez, G., Kamel, A., Soper, J. T., Clarke-Pearson, D. L., and Bast, R. C., Jr.: "Expression of epidermal growth factor receptor and HER-2/neu in normal and neoplastic cervix, vulva, and vagina"; *Obstet.Gynecol.*, 1990, 76(3 Pt 1):381-387
15. Bhadauria, M., Ray, A., Grover, R. K., Sharma, S., Naik, S. L., and Sharma, B. K.: "Oncoprotein c-erbB-2 in squamous cell carcinoma of the uterine cervix and evaluation of its significance in response of disease to treatment"; *Indian J.Physiol Pharmacol.*, 2001, 45(2):191-198
16. Biesterfeld, S., Schuh, S., Muys, L., Rath, W., Mittermayer, C., and Schroder, W.: "Absence of epidermal growth factor receptor expression in squamous cell carcinoma of the uterine cervix is an indicator of limited tumor disease"; *Oncol.Rep.*, 1999, 6(1):205-209
17. Bilous, M., Dowsett, M., Hanna, W., Isola, J., Lebeau, A., Moreno, A., Penault-Llorca, F., Ruschoff, J., Tomasic, G., and Van, de, V.: "Current perspectives on HER2 testing: a review of national testing guidelines"; *Mod.Pathol.*, 2003, 16(2):173-182
18. Black, R. J., Bray, F., Ferlay, J., and Parkin, D. M.: "Cancer incidence and mortality in the European Union: cancer registry data and estimates of national incidence for 1990"; *Eur.J.Cancer*, 1997, 33(7):1075-1107
19. Blohmer, J. U., Schmalisch, G., Klette, I., Grineisen, Y., Kohls, A., Guski, H., and Lichtenegger, W.: "Increased incidence of cervical intraepithelial neoplasia in young women in the Mitte district, Berlin, Germany"; *Acta Cytol.*, 1999, 43(2):195-200
20. Bobrow, M. N., Harris, T. D., Shaughnessy, K. J., and Litt, G. J.: "Catalyzed reporter deposition, a novel method of signal amplification. Application to immunoassays"; *J.Immunol.Methods.*, 1989, %20;125(1-2):279-285

21. Boing, C. and Kimmig, R.: "[Stage-adapted treatment of cervical carcinoma]"; *MMW.Fortschr.Med.*, 2007, 149(12):32-34
22. Bolzer, A., Kreth, G., Solovei, I., Koehler, D., Saracoglu, K., Fauth, C., Muller, S., Eils, R., Cremer, C., Speicher, M. R., and Cremer, T.: "Three-dimensional maps of all chromosomes in human male fibroblast nuclei and prometaphase rosettes"; *PLoS.Biol.*, 2005, 3(5):e157
23. Bosch, F. X., Manos, M. M., Munoz, N., Sherman, M., Jansen, A. M., Peto, J., Schiffman, M. H., Moreno, V., Kurman, R., and Shah, K. V.: "Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. International biological study on cervical cancer (IBSCC) Study Group"; *J.Natl.Cancer Inst.*, 1995, 87(11):796-802
24. Bratti, M. C., Rodriguez, A. C., Schiffman, M., Hildesheim, A., Morales, J., Alfaro, M., Guillen, D., Hutchinson, M., Sherman, M. E., Eklund, C., Schussler, J., Buckland, J., Morera, L. A., Cardenas, F., Barrantes, M., Perez, E., Cox, T. J., Burk, R. D., and Herrero, R.: "Description of a seven-year prospective study of human papillomavirus infection and cervical neoplasia among 10000 women in Guanacaste, Costa Rica,"; *Rev.Panam.Salud Publica*, 2004, 15(2):75-89
25. Brecevic, L., Michel, S., Starke, H., Muller, K., Kosyakova, N., Mrasek, K., Weise, A., and Liehr, T.: "Multicolor FISH used for the characterization of small supernumerary marker chromosomes (sSMC) in commercially available immortalized cell lines"; *Cytogenet.Genome Res.*, 2006, 114(3-4):319-324
26. Burk, R. D., Ho, G. Y., Beardsley, L., Lempa, M., Peters, M., and Bierman, R.: "Sexual behavior and partner characteristics are the predominant risk factors for genital human papillomavirus infection in young women"; *J.Infect.Dis.*, 1996, 174(4):679-689
27. Chang, J. L., Tsao, Y. P., Liu, D. W., Han, C. P., Lee, W. H., and Chen, S. L.: "The expression of type I growth factor receptors in the squamous neoplastic changes of uterine cervix"; *Gynecol.Oncol.*, 1999, 73(1):62-71
28. Chang, T. C., Lai, C. H., Hong, J. H., Hsueh, S., Huang, K. G., Chou, H. H., Tseng, C. J., Tsai, C. S., Chang, J. T., Lin, C. T., Chang, H. H., Chao, P. J., Ng, K. K., Tang, S. G., and Soong, Y. K.: "Randomized trial of neoadjuvant cisplatin, vincristine, bleomycin, and radical hysterectomy versus radiation therapy for bulky stage IB and IIA cervical cancer"; *J.Clin.Oncol.*, 2000, 18(8):1740-1747
29. Chavez-Blanco, A., Perez-Sanchez, V., Gonzalez-Fierro, A., Vela-Chavez, T., Candelaria, M., Cetina, L., Vidal, S., and Duenas-Gonzalez,

- A.: "HER2 expression in cervical cancer as a potential therapeutic target"; *BMC.Cancer*, 2004, 4():59
30. Chen, R. J., Lin, Y. H., Chen, C. A., Huang, S. C., Chow, S. N., and Hsieh, C. Y.: "Influence of histologic type and age on survival rates for invasive cervical carcinoma in Taiwan"; *Gynecol.Oncol.*, 1999, 73(2):184-190
  31. Chen, Y., Miller, C., Mosher, R., Zhao, X., Deeds, J., Morrissey, M., Bryant, B., Yang, D., Meyer, R., Cronin, F., Gostout, B. S., Smith-McCune, K., and Schlegel, R.: "Identification of cervical cancer markers by cDNA and tissue microarrays"; *Cancer Res.*, 2003, 63(8):1927-1935
  32. Cheng, Q., Lau, W. M., Tay, S. K., Chew, S. H., Ho, T. H., and Hui, K. M.: "Identification and characterization of genes involved in the carcinogenesis of human squamous cell cervical carcinoma"; *Int.J.Cancer.*, 2002, 98(3):419-426
  33. Cho, N. H., Kim, Y. B., Park, T. K., Kim, G. E., Park, K., and Song, K. J.: "P63 and EGFR as prognostic predictors in stage IIB radiation-treated cervical squamous cell carcinoma"; *Gynecol.Oncol.*, 2003, 91(2):346-353
  34. Contreras, D. N., Cobos, E., and Lox, C. D.: "Evaluation of the circulating fraction of the HER-2/neu oncogene in patients with cervical cancer"; *Eur.J.Gynaecol.Oncol.*, 2002, 23(6):491-495
  35. Costa, M. J., Walls, J., and Trelford, J. D.: "c-erbB-2 oncoprotein overexpression in uterine cervix carcinoma with glandular differentiation. A frequent event but not an independent prognostic marker because it occurs late in the disease"; *Am.J.Clin.Pathol.*, 1995, 104(6):634-642
  36. Costa, M. J. and Walls, J.: "Epidermal growth factor receptor and c-erbB-2 oncoprotein expression in female genital tract carcinosarcomas (malignant mixed mullerian tumors). Clinicopathologic study of 82 cases"; *Cancer.*, 1996, 77(3):533-542
  37. de Villiers, E. M.: "Papillomavirus and HPV typing"; *Clin.Dermatol.*, 1997, 15(2):199-206
  38. Dent, P., Yacoub, A., Contessa, J., Caron, R., Amorino, G., Valerie, K., Hagan, M. P., Grant, S., and Schmidt-Ullrich, R.: "Stress and radiation-induced activation of multiple intracellular signaling pathways"; *Radiat.Res.*, 2003, 159(3):283-300
  39. Distefano, M., Ferrandina, G., Smaniotto, D., Margariti, A. P., Zannoni, G., Macchia, G., Manfredi, R., Mangiacotti, M. G., Cellini, N., and Scambia, G.: "Concomitant radiochemotherapy plus surgery in locally

- advanced cervical cancer: update of clinical outcome and cyclooxygenase-2 as predictor of treatment susceptibility"; *Oncology*, 2004, 67(2):103-111
40. Donato, N. J., Perez, M., Kang, H., Siddik, Z. H., Ling, Y. H., and Perez-Soler, R.: "EGF receptor and p21WAF1 expression are reciprocally altered as ME-180 cervical carcinoma cells progress from high to low cisplatin sensitivity"; *Clin.Cancer Res.*, 2000, 6(1):193-202
  41. Dornhofer, N. and Hockel, M.: "New developments in the surgical therapy of cervical carcinoma"; *Ann.N.Y.Acad.Sci.*, 2008, 1138:233-52.():233-252
  42. Ebert, A. D., Ulrich, U., Beckmann, M. W., and Schneider, A.: "[Unanswered questions in the management of cervical cancer]"; *Zentralbl.Gynakol.*, 2006, 128(1):23-26
  43. Eichele, K., Ramer, R., and Hinz, B.: "Decisive role of cyclooxygenase-2 and lipocalin-type prostaglandin D synthase in chemotherapeutics-induced apoptosis of human cervical carcinoma cells"; *Oncogene.*, 2008, 27(21):3032-3044
  44. Elrick, L. J., Jorgensen, H. G., Mountford, J. C., and Holyoake, T. L.: "Punish the parent not the progeny"; *Blood.*, 2005, 105(5):1862-1866
  45. Emmert-Buck, M. R., Strausberg, R. L., Krizman, D. B., Bonaldo, M. F., Bonner, R. F., Bostwick, D. G., Brown, M. R., Buetow, K. H., Chuaqui, R. F., Cole, K. A., Duray, P. H., Englert, C. R., Gillespie, J. W., Greenhut, S., Grouse, L., Hillier, L. W., Katz, K. S., Klausner, R. D., Kuznetsov, V., Lash, A. E., Lennon, G., Linehan, W. M., Liotta, L. A., Marra, M. A., Munson, P. J., Ornstein, D. K., Prabhu, V. V., Prang, C., Schuler, G. D., Soares, M. B., Tolstoshev, C. M., Vocke, C. D., and Waterston, R. H.: "Molecular profiling of clinical tissues specimens: feasibility and applications"; *J.Mol.Diagn.*, 2000, 2(2):60-66
  46. Evander, M., Edlund, K., Gustafsson, A., Jonsson, M., Karlsson, R., Rylander, E., and Wadell, G.: "Human papillomavirus infection is transient in young women: a population-based cohort study"; *J.Infect.Dis.*, 1995, 171(4):1026-1030
  47. Fadare, O. and Zheng, W.: "HER2 protein (p185(HER2)) is only rarely overexpressed in cervical cancer"; *Int.J.Gynecol.Pathol.*, 2004, 23(4):410-411
  48. Ferrandina, G., Lauriola, L., Distefano, M. G., Zannoni, G. F., Gessi, M., Legge, F., Maggiano, N., Mancuso, S., Capelli, A., Scambia, G., and Ranelletti, F. O.: "Increased cyclooxygenase-2 expression is associated

- with chemotherapy resistance and poor survival in cervical cancer patients"; *J.Clin.Oncol.*, 2002, 20(4):973-981
49. Ferrandina, G., Ranelletti, F. O., Legge, F., Lauriola, L., Poerio, A., Zannoni, G. F., Smaniotto, D., Margariti, P. A., Macchia, G., and Scambia, G.: "Cyclooxygenase-2 (COX-2) expression in locally advanced cervical cancer patients undergoing chemoradiation plus surgery"; *Int.J.Radiat.Oncol.Biol.Phys.*, 2003, 55(1):21-27
  50. Ferrandina, G., Ranelletti, F. O., Legge, F., Gessi, M., Salutari, V., Distefano, M. G., Lauriola, L., Zannoni, G. F., Martinelli, E., and Scambia, G.: "Prognostic role of the ratio between cyclooxygenase-2 in tumor and stroma compartments in cervical cancer"; *Clin.Cancer Res.*, 2004, 10(9):3117-3123
  51. Fischer, U.: "Bedeutung histo-morphologischer Parameter zur Prognoseabschätzung beim Karzinom der Cervix uteri ab Stadium pT1b1"; 1998,
  52. Fischer, U., Raptis, G., Gessner, W., Roschlau, U., Dressel, K., Bilek, K., and Horn, L. C.: "[Epidemiology and pathogenesis of cervical cancer]"; *Zentralbl.Gynakol.*, 2001, 123(4):198-205
  53. Franceschi, S., Herrero, R., Clifford, G. M., Snijders, P. J., Arslan, A., Anh, P. T., Bosch, F. X., Ferreccio, C., Hieu, N. T., Lazcano-Ponce, E., Matos, E., Molano, M., Qiao, Y. L., Rajkumar, R., Ronco, G., de, Sanjose S., Shin, H. R., Sukvirach, S., Thomas, J. O., Meijer, C. J., and Munoz, N.: "Variations in the age-specific curves of human papillomavirus prevalence in women worldwide"; *Int.J.Cancer*, 2006, 119(11):2677-2684
  54. Frazer, I. H., Cox, J. T., Mayeaux, E. J., Jr., Franco, E. L., Moscicki, A. B., Palefsky, J. M., Ferris, D. G., Ferenczy, A. S., and Villa, L. L.: "Advances in prevention of cervical cancer and other human papillomavirus-related diseases"; *Pediatr.Infect.Dis.J.*, 2006, 25(2 Suppl):S65-81, quiz
  55. Gaffney, D. K., Holden, J., Zempolich, K., Murphy, K. J., Dicker, A. P., and Dodson, M.: "Elevated COX-2 expression in cervical carcinoma: reduced cause-specific survival and pelvic control"; *Am.J.Clin.Oncol.*, 2001, 24(5):443-446
  56. Gaffney, D. K., Haslam, D., Tsodikov, A., Hammond, E., Seaman, J., Holden, J., Lee, R. J., Zempolich, K., and Dodson, M.: "Epidermal growth factor receptor (EGFR) and vascular endothelial growth factor (VEGF) negatively affect overall survival in carcinoma of the cervix treated with radiotherapy"; *Int.J.Radiat.Oncol.Biol.Phys.*, 2003, 56(4):922-928

57. Gatta, G., Lasota, M. B., and Verdecchia, A.: "Survival of European women with gynaecological tumours, during the period 1978-1989. EUROCARE Working Group"; *Eur.J.Cancer.*, 1998, 34(14 Spec No):2218-2225
58. Golijow, C. D., Abba, M., Mouron, S. A., Gomez, M. A., Guercci, A., and Dulout, F. N.: "Detection of c-erbB-2 gene amplification in cervical scrapes positive for human papillomavirus (HPV)"; *Cancer Invest.*, 2001, 19(7):678-683
59. Goncalves, A., Fabbro, M., Lhomme, C., Gladieff, L., Extra, J. M., Floquet, A., Chaigneau, L., Carrasco, A. T., and Viens, P.: "A phase II trial to evaluate gefitinib as second- or third-line treatment in patients with recurring locoregionally advanced or metastatic cervical cancer"; *Gynecol.Oncol.*, 2008, 108(1):42-46
60. Green, J. A., Kirwan, J. M., Tierney, J. F., Symonds, P., Fresco, L., Collingwood, M., and Williams, C. J.: "Survival and recurrence after concomitant chemotherapy and radiotherapy for cancer of the uterine cervix: a systematic review and meta-analysis"; *Lancet.*, 2001, 358(9284):781-786
61. Gulmann, C. and O'Grady, A.: "Tissue Microarrays: an overview"; *Current Diagnostic Pathology*, 2003, 9(3):149-154
62. Hale, R. J., Buckley, C. H., Fox, H., and Williams, J.: "Prognostic value of c-erbB-2 expression in uterine cervical carcinoma"; *J.Clin.Pathol.*, 1992, 45(7):594-596
63. Hale, R. J., Buckley, C. H., Gullick, W. J., Fox, H., Williams, J., and Wilcox, F. L.: "Prognostic value of epidermal growth factor receptor expression in cervical carcinoma"; *J.Clin.Pathol.*, 1993, 46(2):149-153
64. Half, E., Tang, X. M., Gwyn, K., Sahin, A., Wathen, K., and Sinicrope, F. A.: "Cyclooxygenase-2 expression in human breast cancers and adjacent ductal carcinoma in situ"; *Cancer Res.*, 2002, 62(6):1676-1681
65. Hansgen, G., Kuhnt, T., Pigorsch, S., Strauss, H., and Dunst, J.: "[Adjuvant simultaneous radiochemotherapy after operated uterine cervix carcinoma in high risk situation. Results of a pilot study]"; *Strahlenther.Onkol.*, 2002, 178(2):71-77
66. Hansgen, G., Richter, K., Gerlach, R., Kuhnt, T., and Dunst, J.: "[Prognostic factors after surgery and adjuvant radiotherapy in cervical cancers. A retrospective analysis of 298 patients after surgery and adjuvant radiotherapy]"; *Strahlenther.Onkol.*, 2005, 181(5):285-292

67. Herrera, F. G., Chan, P., Doll, C., Milosevic, M., Oza, A., Syed, A., Pintilie, M., Levin, W., Manchul, L., and Fyles, A.: "A prospective phase I-II trial of the cyclooxygenase-2 inhibitor celecoxib in patients with carcinoma of the cervix with biomarker assessment of the tumor microenvironment"; *Int.J.Radiat.Oncol.Biol.Phys.*, 2007, 67(1):97-103
68. Herrington, C. S.: "Do HPV-negative cervical carcinomas exist?-- revisited"; *J.Pathol.*, 1999, 189(1):1-3
69. Ho, G. Y., Bierman, R., Beardsley, L., Chang, C. J., and Burk, R. D.: "Natural history of cervicovaginal papillomavirus infection in young women"; *N.Engl.J.Med.*, 1998, 338(7):423-428
70. Hockel, M., Horn, L. C., Hentschel, B., Hockel, S., and Naumann, G.: "Total mesometrial resection: high resolution nerve-sparing radical hysterectomy based on developmentally defined surgical anatomy"; *Int.J.Gynecol.Cancer*, 2003, 13(6):791-803
71. Hockel, M., Horn, L. C., and Fritsch, H.: "Association between the mesenchymal compartment of uterovaginal organogenesis and local tumour spread in stage IB-IIIB cervical carcinoma: a prospective study"; *Lancet Oncol.*, 2005, 6(10):751-756
72. Hockel, M.: "[New concepts for surgical therapy of cervical carcinoma]"; *Pathologe*, 2005, 26(4):276-282
73. Hockel, M. and Dornhofer, N.: "Pelvic exenteration for gynaecological tumours: achievements and unanswered questions"; *Lancet Oncol.*, 2006, 7(10):837-847
74. Hockel, M.: "Do we need a new classification for radical hysterectomy? Insights in surgical anatomy and local tumor spread from human embryology"; *Gynecol.Oncol.*, 2007, 107(1 Suppl 1):S106-S112
75. Hockel, M., Horn, L. C., Manthey, N., Braumann, U. D., Wolf, U., Teichmann, G., Frauenschlager, K., Dornhofer, N., and Eichenkel, J.: "Resection of the embryologically defined uterovaginal (Mullerian) compartment and pelvic control in patients with cervical cancer: a prospective analysis"; *Lancet Oncol.*, 2009, 10(7):683-692
76. Hoos, A. and Cordon-Cardo, C.: "Tissue microarray profiling of cancer specimens and cell lines: opportunities and limitations"; *Lab Invest.*, 2001, 81(10):1331-1338
77. Horn, L. C., Fischer, U., and Bilek, K.: "[Pathologic-anatomic description and basic morphological information for management of dysplasias and



- carcinomas of the cervix uteri]; Zentralbl.Gynakol., 2001, 123(5):255-265
- 78.Horn, L. C., Fischer, U., and Bilek, K.: "[Histopathological prognostic factors in primary surgically treated cervix carcinoma]"; Zentralbl.Gynakol., 2001, 123(5):266-274
  - 79.Horn, L. C., Braumann, U. D., Fischer, U., Bilek, K., Richter, C. E., and Einenkel, J.: "Occult tumor cells in pelvic lymph nodes and parametrial tissue of small-sized FIGO IB1 squamous cell carcinomas of the uterine cervix--results of a pilot study"; Pathol.Res.Pract., 2005, 201(7):513-516
  - 80.Horn, L. C., Fischer, U., Raptis, G., Bilek, K., Hentschel, B., Richter, C. E., Braumann, U. D., and Einenkel, J.: "Pattern of invasion is of prognostic value in surgically treated cervical cancer patients"; Gynecol.Oncol., 2006, 103(3):906-911
  - 81.Horn, L. C., Hentschel, B., Bilek, K., Richter, C. E., Einenkel, J., and Leo, C.: "Mixed small cell carcinomas of the uterine cervix: prognostic impact of focal neuroendocrine differentiation but not of Ki-67 labeling index"; Ann.Diagn.Pathol., 2006, 10(3):140-143
  - 82.Hudis, C. A.: "Trastuzumab--mechanism of action and use in clinical practice"; N.Engl.J.Med., 2007, 357(1):39-51
  - 83.Jemal, A., Siegel, R., Ward, E., Hao, Y., Xu, J., Murray, T., and Thun, M. J.: "Cancer statistics, 2008"; CA Cancer J.Clin., 2008, 58(2):71-96
  - 84.Kainz, C., Tempfer, C., Gitsch, G., Heinzl, H., Reinthaller, A., and Breiteneker, G.: "Influence of age and human papillomavirus-infection on reliability of cervical cytopathology"; Arch.Gynecol.Obstet., 1995, 256(1):23-28
  - 85.Kang, S., Kim, M. H., Park, I. A., Kim, J. W., Park, N. H., Kang, D., Yoo, K. Y., Kang, S. B., Lee, H. P., and Song, Y. S.: "Elevation of cyclooxygenase-2 is related to lymph node metastasis in adenocarcinoma of uterine cervix"; Cancer Lett., 2006, 237(2):305-311
  - 86.Kapp, D. S. and Giaccia, A. J.: "New directions for radiation biology research in cancer of the uterine cervix"; J.Natl.Cancer Inst.Monogr, 1996, 21):131-139
  - 87.Karamouzis, M. V., Konstantinopoulos, P. A., and Papavassiliou, A. G.: "Trastuzumab--mechanism of action and use"; N.Engl.J.Med., 2007, 357(16):1664-1666

88. Kedzia, W., Schmidt, M., Frankowski, A., and Spaczynski, M.: "Immunohistochemical assay of p53, cyclin D1, c-erbB2, EGFr and Ki-67 proteins in HPV-positive and HPV-negative cervical cancers"; *Folia Histochem.Cytobiol.*, 2002, 40(1):37-41
89. Kersemaekers, A. M., Fleuren, G. J., Kenter, G. G., Van den Broek, L. J., Uljee, S. M., Hermans, J., and Van, de, V.: "Oncogene alterations in carcinomas of the uterine cervix: overexpression of the epidermal growth factor receptor is associated with poor prognosis"; *Clin.Cancer Res.*, 1999, 5(3):577-586
90. Keys, H. M., Bundy, B. N., Stehman, F. B., Muderspach, L. I., Chafe, W. E., Suggs, C. L., III, Walker, J. L., and Gersell, D.: "Cisplatin, radiation, and adjuvant hysterectomy compared with radiation and adjuvant hysterectomy for bulky stage IB cervical carcinoma"; *N.Engl.J.Med.*, 1999, 340(15):1154-1161
91. Kihana, T., Tsuda, H., Teshima, S., Nomoto, K., Tsugane, S., Sonoda, T., Matsuura, S., and Hirohashi, S.: "Prognostic significance of the overexpression of c-erbB-2 protein in adenocarcinoma of the uterine cervix"; *Cancer.*, 1994, 73(1):148-153
92. Kim, G. E., Kim, Y. B., Cho, N. H., Chung, H. C., Pyo, H. R., Lee, J. D., Park, T. K., Koom, W. S., Chun, M., and Suh, C. O.: "Synchronous coexpression of epidermal growth factor receptor and cyclooxygenase-2 in carcinomas of the uterine cervix: a potential predictor of poor survival"; *Clin.Cancer Res.*, 2004, 10(4):1366-1374
93. Kim, H. J., Wu, H. G., Park, I. A., and Ha, S. W.: "High cyclooxygenase-2 expression is related with distant metastasis in cervical cancer treated with radiotherapy"; *Int.J.Radiat.Oncol.Biol.Phys.*, 2003, 55(1):16-20
94. Kim, J. W., Kim, Y. T., Kim, D. K., Song, C. H., and Lee, J. W.: "Expression of epidermal growth factor receptor in carcinoma of the cervix"; *Gynecol.Oncol.*, 1996, 60(2):283-287
95. Kim, J. W., Kim, Y. T., and Kim, D. K.: "Correlation between EGFR and c-erbB-2 oncoprotein status and response to neoadjuvant chemotherapy in cervical carcinoma"; *Yonsei Med.J.*, 1999, 40(3):207-214
96. Kim, M. H., Seo, S. S., Song, Y. S., Kang, D. H., Park, I. A., Kang, S. B., and Lee, H. P.: "Expression of cyclooxygenase-1 and -2 associated with expression of VEGF in primary cervical cancer and at metastatic lymph nodes"; *Gynecol.Oncol.*, 2003, 90(1):83-90

97. Kim, Y. T., Park, S. W., and Kim, J. W.: "Correlation between expression of EGFR and the prognosis of patients with cervical carcinoma"; *Gynecol.Oncol.*, 2002, 87(1):84-89
98. Kim, Y. T., Kim, S. W., and Yoon, B. S.: "Expression of c-erbB-2 oncoprotein and the prognosis of patients with cervical carcinoma"; *Int.J.Gynaecol.Obstet.*, 2006, 92(2):151-152
99. Knecht, R., Peters, S., Adunka, O., Strebhardt, K., Gstoettner, W., and Hambek, M.: "Carcinomas unresponsive to either cisplatinum or anti-EGFR therapy can be growth inhibited by combination therapy of both agents"; *Anticancer Res.*, 2003, 23(3B):2577-2583
100. Kononen, J., Bubendorf, L., Kallioniemi, A., Barlund, M., Schraml, P., Leighton, S., Torhorst, J., Mihatsch, M. J., Sauter, G., and Kallioniemi, O. P.: "Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens"; *Nat.Med.*, 1998, 4(7):844-847
101. Koutsky, L. A., Holmes, K. K., Critchlow, C. W., Stevens, C. E., Paavonen, J., Beckmann, A. M., DeRouen, T. A., Galloway, D. A., Vernon, D., and Kiviat, N. B.: "A cohort study of the risk of cervical intraepithelial neoplasia grade 2 or 3 in relation to papillomavirus infection"; *N.Engl.J.Med.*, 1992, 327(18):1272-1278
102. Kristensen, G. B., Holm, R., Abeler, V. M., and Trope, C. G.: "Evaluation of the prognostic significance of cathepsin D, epidermal growth factor receptor, and c-erbB-2 in early cervical squamous cell carcinoma. An immunohistochemical study"; *Cancer.*, 1996, 78(3):433-440
103. Lakshmi, S., Nair, M. B., Jayaprakash, P. G., Rajalekshmy, T. N., Nair, M. K., and Pillai, M. R.: "c-erbB-2 oncoprotein and epidermal growth factor receptor in cervical lesions"; *Pathobiology.*, 1997, 65(3):163-168
104. Landoni, F., Manco, A., Colombo, A., Placa, F., Milani, R., Perego, P., Favini, G., Ferri, L., and Mangioni, C.: "Randomised study of radical surgery versus radiotherapy for stage Ib-IIa cervical cancer"; *Lancet.*, 1997, 350(9077):535-540
105. Leath, C. A., III, Straughn, J. M., Jr., Kirby, T. O., Huggins, A., Partridge, E. E., and Parham, G. P.: "Predictors of outcomes for women with cervical carcinoma"; *Gynecol.Oncol.*, 2005, 99(2):432-436
106. Lee, C. M., Lee, R. J., Hammond, E., Tsodikov, A., Dodson, M., Zempolich, K., and Gaffney, D. K.: "Expression of HER2neu (c-erbB-2) and epidermal growth factor receptor in cervical cancer: prognostic

correlation with clinical characteristics, and comparison of manual and automated imaging analysis"; *Gynecol.Oncol.*, 2004, 93(1):209-214

107. Lee, C. M., Shrieve, D. C., Zempolich, K. A., Lee, R. J., Hammond, E., Handrahan, D. L., and Gaffney, D. K.: "Correlation between human epidermal growth factor receptor family (EGFR, HER2, HER3, HER4), phosphorylated Akt (P-Akt), and clinical outcomes after radiation therapy in carcinoma of the cervix"; *Gynecol.Oncol.*, 2005, 99(2):415-421
108. Lee, J. M., Lee, K. B., Nam, J. H., Ryu, S. Y., Bae, D. S., Park, J. T., Kim, S. C., Cha, S. D., Kim, K. R., Song, S. Y., and Kang, S. B.: "Prognostic factors in FIGO stage IB-IIA small cell neuroendocrine carcinoma of the uterine cervix treated surgically: results of a multi-center retrospective Korean study"; *Ann.Oncol.*, 2008, 19(2):321-326
109. Lee, J. S., Choi, Y. D., Lee, J. H., Nam, J. H., Choi, C., Lee, M. C., Park, C. S., Juhng, S. W., Kim, H. S., and Min, K. W.: "Expression of cyclooxygenase-2 in adenocarcinomas of the uterine cervix and its relation to angiogenesis and tumor growth"; *Gynecol.Oncol.*, 2004, 95(3):523-529
110. Lelli, G., Cataldo, S., Carandina, I., Urbini, B., Bonetti, F., Marzola, M., Biasco, G., Pantaleo, M. A., Brandes, A., Calandri, C., Ravaioli, E., Nanni, O., Boni, C., Banzi, C., Negri, F., Panetta, A., DI, Fabio F., and Turci, D.: "The role of cetuximab in pre-treated refractory patients with metastatic colorectal cancer: outcome study in clinical practice"; *J.Chemother.*, 2008, 20(3):374-379
111. Leung, T. W., Cheung, A. N., Cheng, D. K., Wong, L. C., and Ngan, H. Y.: "Expressions of c-erbB-2, epidermal growth factor receptor and pan-ras proto-oncogenes in adenocarcinoma of the cervix: correlation with clinical prognosis"; *Oncol.Rep.*, 2001, 8(5):1159-1164
112. Macgregor, J. E., Campbell, M. K., Mann, E. M., and Swanson, K. Y.: "Screening for cervical intraepithelial neoplasia in north east Scotland shows fall in incidence and mortality from invasive cancer with concomitant rise in preinvasive disease"; *BMJ*, 1994, 308(6941):1407-1411
113. Madeleine, M. M., Daling, J. R., Schwartz, S. M., Shera, K., McKnight, B., Carter, J. J., Wipf, G. C., Critchlow, C. W., McDougall, J. K., Porter, P., and Galloway, D. A.: "Human papillomavirus and long-term oral contraceptive use increase the risk of adenocarcinoma in situ of the cervix"; *Cancer Epidemiol.Biomarkers Prev.*, 2001, 10(3):171-177

114. Man, S. and Fiander, A.: "Immunology of human papillomavirus infection in lower genital tract neoplasia"; *Best.Pract.Res.Clin.Obstet.Gynaecol.*, 2001, 15(5):701-714
115. Mandai, M., Konishi, I., Koshiyama, M., Komatsu, T., Yamamoto, S., Nanbu, K., Mori, T., and Fukumoto, M.: "Altered expression of nm23-H1 and c-erbB-2 proteins have prognostic significance in adenocarcinoma but not in squamous cell carcinoma of the uterine cervix"; *Cancer.*, 1995, 75(10):2523-2529
116. Mark, H. F., Feldman, D., Das, S., Sun, C. L., Samy, M., and Lathrop, J.: "HER-2/neu oncogene amplification in cervical cancer studied by fluorescent in situ hybridization"; *Genet.Test.*, 1999, 3(2):237-242
117. Maruo, T., Yamasaki, M., Ladines-Llave, C. A., and Mochizuki, M.: "Immunohistochemical demonstration of elevated expression of epidermal growth factor receptor in the neoplastic changes of cervical squamous epithelium"; *Cancer.*, 1992, 69(5):1182-1187
118. Marzano, R., Corrado, G., Merola, R., Sbiroli, C., Guadagni, F., Vizza, E., Del Nonno F., Carosi, M., Galati, M. M., Sperduti, I., and Cianciulli, A. M.: "Analysis of chromosomes 3, 7, X and the EGFR gene in uterine cervical cancer progression"; *Eur.J.Cancer.*, 2004, 40(10):1624-1629
119. Masferrer, J. L., Leahy, K. M., Koki, A. T., Zweifel, B. S., Settle, S. L., Woerner, B. M., Edwards, D. A., Flickinger, A. G., Moore, R. J., and Seibert, K.: "Antiangiogenic and antitumor activities of cyclooxygenase-2 inhibitors"; *Cancer Res.*, 2000, 60(5):1306-1311
120. Mathur, R. S., Mathur, S. P., and Young, R. C.: "Up-regulation of epidermal growth factor-receptors (EGF-R) by nicotine in cervical cancer cell lines: this effect may be mediated by EGF"; *Am.J.Reprod.Immunol.*, 2000, 44(2):114-120
121. Matsuura, Y., Kawagoe, T., Toki, N., Tanaka, M., and Kashimura, M.: "Long-standing complications after treatment for cancer of the uterine cervix--clinical significance of medical examination at 5 years after treatment"; *Int.J.Gynecol.Cancer*, 2006, 16(1):294-297
122. Mitsuhashi, A., Tanaka, N., Suzuka, K., Matsui, H., Seki, K., and Sekiya, S.: "Detection of epidermal growth factor receptor mRNA in peripheral blood of cervical cancer patients"; *Gynecol.Oncol.*, 2003, 89(3):480-485
123. Morris, M., Eifel, P. J., Lu, J., Grigsby, P. W., Levenback, C., Stevens, R. E., Rotman, M., Gershenson, D. M., and Mutch, D.

- G.: "Pelvic radiation with concurrent chemotherapy compared with pelvic and para-aortic radiation for high-risk cervical cancer"; *N.Engl.J.Med.*, 1999, 340(15):1137-1143
124. Munoz, N.: "Cervical cancer: Epidemiology and risk factors"; *Zentralbl.Gynäkol*, 1997, 119
  125. Nagai, N., Tian, X., Mukai, K., Hirata, E., Kusuda, T., Shiroyama, Y., Shigemasa, K., and Ohama, K.: "Overexpression of cyclooxygenase-2 protein and its relationship to apoptosis in cervical carcinoma treated with neoadjuvant chemotherapy"; *Int.J.Mol.Med.*, 2003, 12(5):709-714
  126. Nakano, T., Oka, K., Ishikawa, A., and Morita, S.: "Correlation of cervical carcinoma c-erb B-2 oncogene with cell proliferation parameters in patients treated with radiation therapy for cervical carcinoma"; *Cancer.*, 1997, 79(3):513-520
  127. Ndubisi, B., Sanz, S., Lu, L., Podczaski, E., Benrubi, G., and Masood, S.: "The prognostic value of HER-2/neu oncogene in cervical cancer"; *Ann.Clin.Lab Sci.*, 1997, 27(6):396-401
  128. Nevin, J., Laing, D., Kaye, P., McCulloch, T., Barnard, R., Silcocks, P., Blackett, T., Paterson, M., Sharp, F., and Cruse, P.: "The significance of Erb-b2 immunostaining in cervical cancer"; *Gynecol.Oncol.*, 1999, 73(3):354-358
  129. Niibe, Y., Nakano, T., Ohno, T., Suzuki, Y., Oka, K., and Tsujii, H.: "Prognostic significance of c-erbB-2/HER2 expression in advanced uterine cervical carcinoma with para-aortic lymph node metastasis treated with radiation therapy"; *Int.J.Gynecol.Cancer*, 2003, 13(6):849-855
  130. Nishioka, T., West, C. M., Gupta, N., Wilks, D. P., Hendry, J. H., Davidson, S. E., and Hunter, R. D.: "Prognostic significance of c-erbB-2 protein expression in carcinoma of the cervix treated with radiotherapy"; *J.Cancer Res.Clin.Oncol.*, 1999, 125(2):96-100
  131. Noller, K. L.: "Incident and demographic trends in cervical neoplasia"; *Am.J.Obstet.Gynecol.*, 1996, 175(4 Pt 2):1088-1090
  132. Oh, M. J., Choi, J. H., Kim, I. H., Lee, Y. H., Huh, J. Y., Park, Y. K., Lee, K. W., Chough, S. Y., Joo, K. S., Ku, B. S., and Saw, H. S.: "Detection of epidermal growth factor receptor in the serum of patients with cervical carcinoma"; *Clin.Cancer Res.*, 2000, 6(12):4760-4763

133. Oka, K., Nakano, T., and Arai, T.: "c-erbB-2 Oncoprotein expression is associated with poor prognosis in squamous cell carcinoma of the cervix"; *Cancer.*, 1994, 73(3):664-671
134. Oriel, J. D.: "Natural history of genital warts. 1971"; *Sex Transm.Infect.*, 2000, 76 Suppl 1():S21
135. Oshima, M., Dinchuk, J. E., Kargman, S. L., Oshima, H., Hancock, B., Kwong, E., Trzaskos, J. M., Evans, J. F., and Taketo, M. M.: "Suppression of intestinal polyposis in Apc delta716 knockout mice by inhibition of cyclooxygenase 2 (COX-2)"; *Cell.*, 1996, 87(5):803-809
136. Ostor, A. G.: "Natural history of cervical intraepithelial neoplasia: a critical review"; *Int.J.Gynecol.Pathol.*, 1993, 12(2):186-192
137. Parazzini, F., Negri, E., La, Vecchia C., and Bocciolone, L.: "Screening practices and invasive cervical cancer risk in different age strata"; *Gynecol.Oncol.*, 1990, 38(1):76-80
138. Parazzini, F. and La, Vecchia C.: "Epidemiology of adenocarcinoma of the cervix"; *Gynecol.Oncol.*, 1990, 39(1):40-46
139. Pearcey, R., Brundage, M., Drouin, P., Jeffrey, J., Johnston, D., Lukka, H., MacLean, G., Souhami, L., Stuart, G., and Tu, D.: "Phase III trial comparing radical radiotherapy with and without cisplatin chemotherapy in patients with advanced squamous cell cancer of the cervix"; *J.Clin.Oncol.*, 2002, 20(4):966-972
140. Petereit, D. G. and Pearcey, R.: "Literature analysis of high dose rate brachytherapy fractionation schedules in the treatment of cervical cancer: is there an optimal fractionation schedule?"; *Int.J.Radiat.Oncol.Biol.Phys.*, 1999, 43(2):359-366
141. Peters, W. A., III, Liu, P. Y., Barrett, R. J., Stock, R. J., Monk, B. J., Berek, J. S., Souhami, L., Grigsby, P., Gordon, W., Jr., and Alberts, D. S.: "Concurrent chemotherapy and pelvic radiation therapy compared with pelvic radiation therapy alone as adjuvant therapy after radical surgery in high-risk early-stage cancer of the cervix"; *J.Clin.Oncol.*, 2000, 18(8):1606-1613
142. Pfeiffer, D., Stellwag, B., Pfeiffer, A., Borlinghaus, P., Meier, W., and Scheidel, P.: "Clinical implications of the epidermal growth factor receptor in the squamous cell carcinoma of the uterine cervix"; *Gynecol.Oncol.*, 1989, 33(2):146-150
143. Plaza, S. M. and Lamson, D. W.: "Vitamin K2 in bone metabolism and osteoporosis"; *Altern.Med.Rev.*, 2005, 10(1):24-35

144. Plummer, M., Schiffman, M., Castle, P. E., Maucort-Boulch, D., and Wheeler, C. M.: "A 2-year prospective study of human papillomavirus persistence among women with a cytological diagnosis of atypical squamous cells of undetermined significance or low-grade squamous intraepithelial lesion"; *J.Infect.Dis.*, 2007, 195(11):1582-1589
145. Prescott, S. M.: "Is cyclooxygenase-2 the alpha and the omega in cancer?"; *J.Clin.Invest.*, 2000, 105(11):1511-1513
146. Ramalingam, S., Forster, J., Naret, C., Evans, T., Sulecki, M., Lu, H., Teegarden, P., Weber, M. R., and Belani, C. P.: "Dual inhibition of the epidermal growth factor receptor with cetuximab, an IgG1 monoclonal antibody, and gefitinib, a tyrosine kinase inhibitor, in patients with refractory non-small cell lung cancer (NSCLC): a phase I study"; *J.Thorac.Oncol.*, 2008, 3(3):258-264
147. Ravazoula, P., Androutsopoulos, G., Koumoundouroul, D., Michail, G., and Kourounis, G.: "Immunohistochemical detection of HPV proteins and c-erbB receptors in cervical lesion specimens from young women"; *Eur.J.Gynaecol.Oncol.*, 2006, 27(1):69-72
148. Roberts, K. B., Urdaneta, N., Vera, R., Vera, A., Gutierrez, E., Aguilar, Y., Ott, S., Medina, I., Sempere, P., Rockwell, S., Sartorelli, A. C., Fischer, D. B., and Fischer, J. J.: "Interim results of a randomized trial of mitomycin C as an adjunct to radical radiotherapy in the treatment of locally advanced squamous-cell carcinoma of the cervix"; *Int.J.Cancer.*, 2000, 90(4):206-223
149. Roland, P. Y., Stoler, M. H., Broker, T. R., and Chow, L. T.: "The differential expression of the HER-2/neu oncogene among high-risk human papillomavirus-infected glandular lesions of the uterine cervix"; *Am.J.Obstet.Gynecol.*, 1997, 177(1):133-138
150. Rosty, C., Couturier, J., Vincent-Salomon, A., Genin, P., Freneaux, P., Sigal-Zafrani, B., and Sastre-Garau, X.: "Overexpression/amplification of HER-2/neu is uncommon in invasive carcinoma of the uterine cervix"; *Int.J.Gynecol.Pathol.*, 2004, 23(1):13-17
151. Rutledge, T. L., Kamelle, S. A., Tillmanns, T. D., Gould, N. S., Wright, J. D., Cohn, D. E., Herzog, T. J., Rader, J. S., Gold, M. A., Johnson, G. A., Walker, J. L., Mannel, R. S., and McMeekin, D. S.: "A comparison of stages IB1 and IB2 cervical cancers treated with radical hysterectomy. Is size the real difference?"; *Gynecol.Oncol.*, 2004, 95(1):70-76
152. Ryu, H. S., Chang, K. H., Yang, H. W., Kim, M. S., Kwon, H. C., and Oh, K. S.: "High cyclooxygenase-2 expression in stage IB cervical



cancer with lymph node metastasis or parametrial invasion";  
Gynecol.Oncol., 2000, 76(3):320-325

153. Ryu, S. Y., Oka, K., Tsujii, H., Suzuki, Y., and Nakano, T.: "Platelet-derived endothelial cell growth factor as a prognostic factor for radiotherapy outcome in patients with adenocarcinoma of the uterine cervix"; Gynecol.Oncol., 2003, 89(3):414-419
154. Santos, C., Munoz, N., Klug, S., Almonte, M., Guerrero, I., Alvarez, M., Velarde, C., Galdos, O., Castillo, M., Walboomers, J., Meijer, C., and Caceres, E.: "HPV types and cofactors causing cervical cancer in Peru"; Br.J.Cancer, 2001, 85(7):966-971
155. Sawaoka, H., Tsuji, S., Tsujii, M., Gunawan, E. S., Sasaki, Y., Kawano, S., and Hori, M.: "Cyclooxygenase inhibitors suppress angiogenesis and reduce tumor growth in vivo"; Lab Invest., 1999, 79(12):1469-1477
156. Schenk, U. Soost HJ and El Laymony, Y.: "Effektivität gynäkologisch-zytologischer Krebsvorsorgeuntersuchungen"; 12.Fortbildungstagung für klinische Zytologie, 1993
157. Schiffman, M. H. and Brinton, L. A.: "The epidemiology of cervical carcinogenesis"; Cancer, 1995, 76(10 Suppl):1888-1901
158. Schneider, V.: "Tissue microarrays for testing molecular biomarkers of cervical intraepithelial neoplasia: feasibility study"; Acta Cytol., 2006, 50(2):123-128
159. Shi, J., Liu, H., Wilkerson, M., Huang, Y., Meschter, S., Dupree, W., Schuerch, C., and Lin, F.: "Evaluation of p16INK4a, minichromosome maintenance protein 2, DNA topoisomerase IIalpha, ProEX C, and p16INK4a/ProEX C in cervical squamous intraepithelial lesions"; Hum.Pathol., 2007, 38(9):1335-1344
160. Shi, X., Chen, G., Xing, H., Weng, D., Bai, X., and Ma, D.: "VEGF-C, VEGFR-3, and COX-2 enhances growth and metastasis of human cervical carcinoma cell lines in vitro"; Oncol.Rep., 2007, 18(1):241-247
161. Shueng, P. W., Hsu, W. L., Jen, Y. M., Wu, C. J., and Liu, H. S.: "Neoadjuvant chemotherapy followed by radiotherapy should not be a standard approach for locally advanced cervical cancer"; Int.J.Radiat.Oncol.Biol.Phys., 1998, 40(4):889-896
162. Simmons, D. L., Botting, R. M., and Hla, T.: "Cyclooxygenase isozymes: the biology of prostaglandin synthesis and inhibition"; Pharmacol.Rev., 2004, 56(3):387-437

163. Skomedal, H., Kristensen, G. B., Lie, A. K., and Holm, R.: "Aberrant expression of the cell cycle associated proteins TP53, MDM2, p21, p27, cdk4, cyclin D1, RB, and EGFR in cervical carcinomas"; *Gynecol.Oncol.*, 1999, 73(2):223-228
164. Smith, Js, Lindsay, L, Hoots, B, and et al.: "Human papillomavirus type distribution in invasive cervical cancer and high-grade cervical lesions: a meta-analysis update"; *Int.J.Cancer*, 2007, 121():621-632
165. Soh, L. T., Heng, D., Lee, I. W., Ho, T. H., and Hui, K. M.: "The relevance of oncogenes as prognostic markers in cervical cancer"; *Int.J.Gynecol.Cancer.*, 2002, 12(5):465-474
166. Soost, H. J., Lehmacher, W., and Ruffing-Kullmann, B.: "[To what extent have early cancer detection and preventive examination for cancer of the uterine cervix fulfilled established expectations?]; *Geburtshilfe Frauenheilkd.*, 1989, 49(6):579-586
167. Sotlar, K: "Die Infektion mit humanen Papillomaviren"; *Der Pathologe*, 8 A.D., 00006/2008():153-156
168. Soto-Cruz, I., Rangel-Corona, R., Valle-Mendiola, A., Moreno-Morales, X., Santiago-Perez, R., Weiss-Steider, B., and Caceres-Cortes, J. R.: "The tyrphostin B42 inhibits cell proliferation and HER-2 autophosphorylation in cervical carcinoma cell lines"; *Cancer Invest*, 2008, 26(2):136-144
169. Stanley, M. A.: "Immunobiology of papillomavirus infections"; *J.Reprod.Immunol.*, 2001, 52(1-2):45-59
170. Stenkvist, B. and Soderstrom, J.: "Reasons for cervical cancer despite extensive screening"; *J.Med.Screen.*, 1996, 3(4):204-207
171. Storniolo, A. M., Pegram, M. D., Overmoyer, B., Silverman, P., Peacock, N. W., Jones, S. F., Loftiss, J., Arya, N., Koch, K. M., Paul, E., Pandite, L., Fleming, R. A., Lebowitz, P. F., Ho, P. T., and Burris, H. A., III: "Phase I dose escalation and pharmacokinetic study of lapatinib in combination with trastuzumab in patients with advanced ErbB2-positive breast cancer"; *J.Clin.Oncol.*, 2008, 26(20):3317-3323
172. Streich, M.: "Das Zervixkarzinom: praxisrelevante Aspekte"; *Gynäkologie*, 5 A.D., ):23-25
173. Strickler, H. D., Burk, R. D., Fazzari, M., Anastos, K., Minkoff, H., Massad, L. S., Hall, C., Bacon, M., Levine, A. M., Watts, D. H., Silverberg, M. J., Xue, X., Schlecht, N. F., Melnick, S., and Palefsky, J. M.: "Natural history and possible reactivation of human papillomavirus in

- human immunodeficiency virus-positive women"; J.Natl.Cancer Inst., 2005, 97(8):577-586
174. Sung, H. Y., Kearney, K. A., Miller, M., Kinney, W., Sawaya, G. F., and Hiatt, R. A.: "Papanicolaou smear history and diagnosis of invasive cervical carcinoma among members of a large prepaid health plan"; Cancer., 2000, 88(10):2283-2289
  175. Tattersall, M. H., Lorvidhaya, V., Vootiprux, V., Cheirsilpa, A., Wong, F., Azhar, T., Lee, H. P., Kang, S. B., Manalo, A., Yen, M. S., and .: "Randomized trial of epirubicin and cisplatin chemotherapy followed by pelvic radiation in locally advanced cervical cancer. Cervical Cancer Study Group of the Asian Oceanian Clinical Oncology Association"; J.Clin.Oncol., 1995, 13(2):444-451
  176. Thalheimer, A., Illert, B., Reimer, P., Bueter, M., Thiede, A., Gasser, M., Fein, M., Waaga-Gasser, A. M., and Meyer, D.: "[Antibody treatment in colorectal cancer--what the surgeon needs to know]; Zentralbl.Chir, 2008, 133(2):101-106
  177. Tiffen, J. and Mahon, S. M.: "Cervical cancer: what should we tell women about screening?"; Clin.J.Oncol.Nurs., 2006, 10(4):527-531
  178. Tsujii, M., Kawano, S., and DuBois, R. N.: "Cyclooxygenase-2 expression in human colon cancer cells increases metastatic potential"; Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A., 1997, 94(7):3336-3340
  179. van Dam, P. A., Lowe, D. G., Watson, J. V., James, M., Chard, T., Hudson, C. N., and Shepherd, J. H.: "Multiparameter flow-cytometric quantitation of epidermal growth factor receptor and c-erbB-2 oncoprotein in normal and neoplastic tissues of the female genital tract"; Gynecol.Oncol., 1991, 42(3):256-264
  180. van de, Rijn M., Perou, C. M., Tibshirani, R., Haas, P., Kallioniemi, O., Kononen, J., Torhorst, J., Sauter, G., Zuber, M., Kochli, O. R., Mross, F., Dieterich, H., Seitz, R., Ross, D., Botstein, D., and Brown, P.: "Expression of cytokeratins 17 and 5 identifies a group of breast carcinomas with poor clinical outcome"; Am.J.Pathol., 2002, 161(6):1991-1996
  181. van de, Rijn M. and Gilks, C. B.: "Applications of microarrays to histopathology"; Histopathology., 2004, 44(2):97-108
  182. van Diest, P. J., van, Dam P., Henzen-Logmans, S. C., Berns, E., van der Burg, M. E., Green, J., and Vergote, I.: "A scoring system for immunohistochemical staining: consensus report of the task force for basic research of the EORTC-GCCG. European Organization for

Research and Treatment of Cancer-Gynaecological Cancer Cooperative Group"; J.Clin.Pathol., 1997, 50(10):801-804

183. Vincenzi, B., Schiavon, G., Silletta, M., Santini, D., and Tonini, G.: "The biological properties of cetuximab"; Crit Rev.Oncol.Hematol., 2008
184. von Knebel, Doeberitz M.: "[Aspects of molecular pathogenesis of cervical cancer in establishing new tumor markers for early detection and diagnosis]"; Zentralbl.Gynakol., 2001, 123(4):186-191
185. Walboomers, J. M., Jacobs, M. V., Manos, M. M., Bosch, F. X., Kummer, J. A., Shah, K. V., Snijders, P. J., Peto, J., Meijer, C. J., and Munoz, N.: "Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide"; J.Pathol., 1999, 189(1):12-19
186. Werner, M., Von, Wasielewski R., and Komminoth, P.: "Antigen retrieval, signal amplification and intensification in immunohistochemistry"; Histochem.Cell Biol., 1996, 105(4):253-260
187. Williams, C. S., Tsujii, M., Reese, J., Dey, S. K., and DuBois, R. N.: "Host cyclooxygenase-2 modulates carcinoma growth"; J.Clin.Invest., 2000, 105(11):1589-1594
188. Woodburn, J. R.: "The epidermal growth factor receptor and its inhibition in cancer therapy"; Pharmacol.Ther., 1999, 82(2-3):241-250

## **8. Danksagung**

Für die Überlassung des Dissertationsthemas sowie die umfangreiche Betreuung und Hilfestellung bei der histologischen Nachuntersuchung der Präparate und die wissenschaftlich – fachliche Beratung insgesamt möchte ich mich ganz herzlich bei meinem Betreuer Herrn Prof. Dr. med. Lars-Christian Horn bedanken.

Ich möchte mich bei Frau R. Scherling ganz herzlichst bedanken zum einen für die Hilfe bei der Immunhistochemie, zum anderen dafür, dass sie mir immer mit Rat und Tat zur Seite stand und mich aufbaute.

Frau C. Koschke und Frau K. Fahr danke ich ebenso für ihre Unterstützung in der immunhistochemischen Arbeit.

Die drei Frauen hatten durch ihre Unterstützung einen wesentlichen Anteil am Gelingen meiner Arbeit.

Frau D. Loth gilt ein großer Dank für ihre unermüdliche Hilfsbereitschaft in verzweifelten Momenten und ihre Unterstützung in statistischen Fragen.

Meiner Familie und ganz besonders meinem Ehemann möchte ich für die kontinuierliche Anteilnahme, stetige Motivation und Hilfsbereitschaft während der Promotionszeit von Herzen danken.

## **9. Eidesstaatliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit eigenständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, und dass die vorgelegte Arbeit weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt wurde. Alles aus anderen Quellen oder von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren.

## 10. Lebenslauf

### **Persönliche Daten:**

Name, Vorname: Fritzsche, Julia, geb. Köhler  
Geburtsdatum: 28.07.1981  
Geburtsort: Leipzig  
Anschrift: Auf der Bärenburg 5, 99090 Erfurt  
Familienstand: verheiratet, 1 Kind

### **Schulbildung:**

1988 – 1992 Grundschole Bad Klosterlausnitz  
1992 – 2000 Staatliches Holzlandgymnasium Hermsdorf,  
Abschluss Klasse 12 – Abitur

### **Auslandsaufenthalt:**

07 /2000 – 08 /2001 Northern Community College, Virginia,USA

### **Hochschulbildung:**

10 /2001 – 09 /2002 BWL-Studium, Friedrich-Schiller-Universität Jena  
10 /2002 – 03 /2003 Studium der Zahnmedizin, Johann-Wolfgang Goethe  
Universität Frankfurt/ Main  
04 /2003 – 10/2007 Studium der Zahnmedizin, Universität Leipzig  
07 /2003 –Vorphysikum  
02 /2005 – Physikum  
07 /2007 – 10 /2007 Staatsexamen,  
Hochschulabschluss

### **Berufstätigkeit:**

11/2007 – Weiterbildungsassistentin Oralchirurgie in der Klinik  
für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie/ Plastische  
Operation des HELIOS Klinikums Erfurt sowie in der  
Praxis Dr. Steidl in Sömmerda